

**Aus dem Institut für Immunologie im Biomedizinischen Centrum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Einfluss der Antigenendosis auf den Phänotyp erschöpfter  
CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Ayuna Asoyan**

aus

Sverdlowsk, UdSSR (heute Jekaterinburg, Russische Föderation)

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Obst
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson
	Priv. Doz. Dr. med. Joachim Andrassy
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	2
1.1.2. Das erworbene Immunsystem	3
1.2. T-Zell-Aktivierung	5
1.3. T-Zell-Differenzierung zu Gedächtniszellen	6
1.4. T-Zell-Antwort während akuter und chronischer Infektionen	7
1.5. CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung im Mausmodell	10
1.6. CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung im Menschen	12
1.7. Zusammenfassung: Erschöpfung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	14
1.8. CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung in der Maus	15
1.9. CD4 <sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung im Menschen	16
1.10. Zugrunde liegende Mechanismen der Erschöpfung	17
1.11. Rolle der Antigenendosis bei der T-Zell-Erschöpfung	19
<b>2. Materialien und Methoden</b>	21
2.1. Material und Versuchstiere	21
2.1.1. Verbrauchsmaterial	21
2.1.2. Chemikalien	22
2.1.3. Software	24
2.1.4. Antikörper	24
2.1.5. Versuchstiere	25
2.2. Methoden	28
2.2.1. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR-Analyse	28
2.2.2. Maustypisierung mittels FACS-Analyse	31
2.2.3. Organentnahme und Präparation	32
2.2.4. Anreicherung der CD4 <sup>+</sup> Zellen durch MACS Isolation	32
2.2.5. Adoptiver Zelltransfer	33
2.2.6. Intravenöse Injektion in die Schwanzvene	34
2.2.7. Anti-CD40-Behandlung	34
2.2.8. Doxycyclin-Behandlung	34

2.2.9. Färbemethoden und durchflusszytometrische Zellanalyse .....	34
2.2.10. Proliferationsassays .....	37
2.2.11. Statistische Auswertung .....	38
<b>3. Fragestellung</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1. Charakterisierung der Versuchstiere .....	41
4.1.1. Spendertiere: Quelle der untersuchten T-Zellen .....	41
4.1.2. Empfängertiere mit steuerbarer Antigenpräsentation .....	46
4.2. Änderung der Doxycyclindosis - Änderung der Antigenpräsentation? .....	49
4.3. Nachweis der reduzierten Präsentation des Antigens durch die Reduktion der Doxycyclin-Dosis in Mäusen der li-rTAxTIM-Linie nach vorausgehender hochdosierter Doxycyclin-Gabe .....	51
4.4. Untersuchung des Proliferationsverhaltens von T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	53
4.5. Ermittlung des Aktivierungszustandes antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 7- tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen .....	56
4.6. Messung der Zytokinsekretion antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> nach 7-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	60
4.7. Untersuchung des Proliferationsverhaltens antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 28- tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	62
4.8. Ermittlung des Aktivierungszustandes antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 28- tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen .....	64
4.9. Zytokinproduktion antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 28-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	66
4.10. Ermittlung absoluter und relativer T-Zellzahlen pro Empfängermilz. Kommt es während der Erschöpfungsphase zur Deletion der spezifischen Zellen? .....	68

4.11. Untersuchung der TCR-Expression auf der Oberfläche spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigenendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	70
4.12. Messung des phosphorylierten Transkriptionsfaktor Jun in antigenspezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigenendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen .....	72
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>75</b>
5.1. Infektionsmodell versus doppelt-transgenes Modell.....	75
5.2. Einfluss der Antigenendosis auf die T-Zell Erschöpfung .....	76
5.3. Einfluss der Dauer der Antigenpräsentation auf die T-Zell-Erschöpfung .....	77
5.4. Mechanismen der T-Zell Erschöpfung.....	78
5.5. Rolle der MAPK-Signalkaskade in der T-Zell-Erschöpfung.....	79
5.6. Chronische Antigenstimulation und Expression inhibitorischer Moleküle .....	80
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>82</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Als Immunsystem bezeichnen wir das komplexe Netzwerk und das Zusammenspiel verschiedener Organe, Zellen und molekularer Bestandteile, welches der Abwehr höherer Lebewesen von Mikroorganismen, Fremdkörpern, sowie eigenen maligne entarteten Zellen dient (Parkin and Cohen, 2001). Die Funktion des Immunsystems ist in seiner Bezeichnung inbegriffen: „immunis“ ist der lateinische Ausdruck, welcher zunächst für privilegierte Soldaten römischer Legionen, welche abgaben- und steuerfrei waren, verwendet wurde und nun für „frei“, „unversehrt“ und „rein“ steht.

Die Haut und Schleimhäute stellen eine physische Barriere des Organismus dar und verhindern das Eindringen von Krankheitserregern in den Körper (Engebretsen and Thyssen, 2016). Wird diese Barriere durchbrochen, werden lösliche und zelluläre Komponenten des Immunsystems im Blut aktiviert und versuchen die als gefährlich eingestuften Erreger oder infizierte und entartete Zellen im Körper zu zerstören (Parkin and Cohen, 2001). Dabei unterliegt das Immunsystem multiplen regulatorischen Einflüssen zentraler und lokaler Art, neuronaler und endokriner Genese (Ganesan and Chawla, 2014). Zellen des Immunsystems kommunizieren miteinander durch direkten Kontakt oder durch Botenstoffe. Es ist von immenser Bedeutung für den ganzen Organismus, dass alle Teile seiner Immunabwehr funktionsfähig sind und pathogene Mikroorganismen, Zellen oder Moleküle auch als solche erkannt und bekämpft werden. Geschieht dies aufgrund eines Immundefektes nicht, wird die Gesundheit und sogar das Leben des Individuums durch Infektionen gefährdet.

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bleiben infektiöse Erkrankungen weiterhin unter den häufigsten Todesursachen weltweit (www.who.int, Fact sheet 310). Vor allem chronische Infektionen stellen das globale Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung. Laut der WHO sind über 390 Millionen Menschen weltweit an den chronischen viralen Hepatitiden erkrankt, 257 Millionen leiden an einer Hepatitis B-Infektion, etwa 170 Millionen sind mit Hepatitis C Virus infiziert (Shepard et al., 2005), über 950.000 sterben jährlich an den Langzeitfolgen wie Leberzirrhose oder hepatozelluläres Carcinom, 36,8 Millionen Menschen lebten Ende 2016 mit HIV, welches unbehandelt fast immer zum Ausbruch von AIDS führt. Dabei haben lediglich rund 19,5 Millionen Menschen Zugang zur hochaktiven antiretroviralen Therapie. (www.who.int, Fact sheet 164, Fact sheet 204).

Chronische Infektionen sind fast immer mit einer ineffektiven antiviralen Immunität verbunden (Frebel et al., 2010). Somit ist für die erfolgreiche Diagnostik und Therapie von infektiösen, aber auch autoimmunen Erkrankungen sowie von Allergien und malignen Tumoren das Verständnis über ihre Entstehung im Zusammenhang mit Fehlfunktionen des Immunsystems unentbehrlich.

Das Immunsystem wird nach Reaktionsgeschwindigkeit und Spezifität der Antwort ihrer Komponenten in das angeborene/unspezifische und erworbene/spezifische Immunsystem unterteilt, wobei beide Bestandteile eng zusammenarbeiten und voneinander nicht zu trennen sind.

### **1.1.1. Das angeborene Immunsystem**

Zum unspezifischen, phylogenetisch älteren Immunsystem gehören zum einen physikalische Körperbarrieren in Form von intakter Haut und Schleimhäuten, die das Eindringen pathogener Mikroorganismen verhindern, die Darmperistaltik und der Zilienschlag der Haarzellen im Respirationstrakt, die zur Befreiung von inkorporierten Partikeln beitragen (Engelbrecht and Thyssen, 2016). Zum anderen spielen körpereigene chemische Substanzen, wie der Säuremantel der Haut, der niedrige pH des Magens, antimikrobielle Enzyme, wie das Lysozym, Immunmediatoren wie Interleukine und Interferone, Akut-Phase-Proteine und das Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen Krankheitserreger (Parkin and Cohen, 2001). Zum Schluss ist eine reguläre Funktion des erworbenen Immunsystems ohne zelluläre Komponenten wie Granulozyten, dem Monozyten-Makrophagen-System und der NK-Zellen nicht denkbar (Parkin and Cohen, 2001).

Kommt es zum Eindringen des Pathogens in den Körper reagiert das angeborene Immunsystem innerhalb von Minuten auf die Gefahr, unabhängig davon, um welchen Erreger es sich dabei handelt und ob dieser dem Körper bekannt ist (Murphy et al., 2012). Meist kommt es bei der Immunantwort zu einer entzündlichen Reaktion, die mit einer vermehrten Durchblutung des infizierten Bereiches, erhöhten kapillären Permeabilität und Migration von Immunkomponenten in die betroffene Region einhergeht (Murphy et al., 2012). Im Rahmen der Inflammation setzen aktivierte Makrophagen Zytokine frei, welche das Knochenmark zur Bildung von Millionen von neutrophilen Granulozyten anregen (Parkin and Cohen, 2001). Diese werden später in die Blutbahn entlassen und gelangen dem Zytokingradienten folgend zu ihrem Einsatzort. Dort verschlingen sie die Erreger, indem sie diese in ein durch einen Teil der Zellmembran gebildetes Vesikel, ein Phagosom, einschließen und intrazellulär abtöten (Witko-Sarsat et al., 2000). Dies kann durch Verschmelzen des Phagosoms mit neutrophilen zytoplasmatischen Granula, welche Lysozym und Myeloperoxidase enthalten, und Bildung des Phagolysosoms oder durch Bildung

von Sauerstoffradikalen erfolgen (Parkin and Cohen, 2001). Gewebsständige Makrophagen nutzen dieses Prinzip der Phagozytose zur Elimination der Erreger. Eosinophile Granulozyten hingegen, die der Abwehr von einzelligen oder mehrzelligen Parasiten dienen, sowie natürliche Killerzellen, die von Viren befallene oder entartete Zellen zerstören, setzen zytotoxische Substanzen auf zuvor mit Antikörpern markierten Zellen frei (Parkin and Cohen, 2001). Da das angeborene Immunsystem jedoch erregerspezifisch agiert, ist die Funktion des erworbenen Immunsystems im Kampf gegen das Pathogen ausschlaggebend.

### **1.1.2. Das erworbene Immunsystem**

Das erworbene Immunsystem besteht aus humoralen und zellulären Bestandteilen, wobei die Antikörper die humoralen und die Lymphozyten die zellulären Komponenten repräsentieren. Die Lymphozyten werden in antikörperbildende B-Zellen und in die Immunantwort-regulierenden, für Zytotoxizität und Hypersensitivität verantwortlichen T-Zellen unterteilt. Die T- und B-Zellen werden jeweils nach dem Ort ihrer Bildung und Reifung benannt: B-Zellen entstehen im Knochenmark (bone marrow), die T-Zellen entwickeln sich im Thymus. Die Antigene auf der Oberfläche der T-Zellen erlauben eine weitere Differenzierung dieser in  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen (Parkin and Cohen, 2001).

#### **1.1.2.1. $CD8^+$ T-Zellen**

Die zytotoxischen T-Zellen, welche CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren, reifen im Thymus und erkennen fremdes Antigen auf MHC-I-Molekülen körpereigener Zellen mithilfe ihres klonal verteilten T-Zell-Rezeptors (Davis et al., 1998). Nach ihrer Aktivierung durch APCs in den sekundär lymphatischen Organen entwickeln sie sich zu hochpotenten antigenspezifischen Killerzellen, welche vor allem mit Bakterien oder Viren infizierte, aber auch maligne entartete Zellen, welche das spezifische Antigen auf ihrer Oberfläche im Kontext der MHC-I Moleküle präsentieren, durch Sekretion von zytolytischen Substanzen wie Granzymen oder Perforinen zerstören (Zhang and Bevan, 2011).

#### **1.1.2.2. $CD4^+$ Zellen**

T-Helferzellen tragen CD4 auf ihrer Oberfläche und haben multiple Funktionen. Es werden mehrere Subtypen unterschieden, wobei das Lymphokinsekretionsprofil und die Funktion die



Zugehörigkeit zum jeweiligen Subtyp bestimmen. Die von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezernierten Lymphokine wirken meist als autokrine Wachstumsfaktoren, können aber auch gleichzeitig die Proliferation anderer Subtypen supprimieren. Th1-Zellen sezernieren Interleukin-2 (IL-2), Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor  $\beta$  (TNF $\beta$ ) (Mosmann et al., 1986; Mosmann and Coffman, 1989). IFN $\gamma$  ist ein Zytokin, welches die Makrophagen und B-Zellen aktiviert, und die Sekretion von IgG-Antikörpern durch die B-Zellen, sowie die Aktivierung von Komplementfaktoren stimuliert, welche die Erreger für Phagozyten, d.h. Makrophagen und neutrophile Granulozyten, opsonieren (Abbas et al., 1996). Außerdem spielt IFN $\gamma$  bei der direkten viralen Abwehr eine Rolle. Th1-vermittelte Antworten sind mit Entzündungen verbunden, da sowohl IFN $\gamma$  und TNF $\beta$  inflammatorische Leukozyten aktivieren (Abbas et al., 1996). IL-2 ist ein Steuerungszytokin, das auf der einen Seite parakrin wirkt und die CD8<sup>+</sup> Antwort aktiviert sowie ihre Expansion induziert (Tham and Mescher, 2002). Auf der anderen Seite wirkt es autokrin und stimuliert die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der frühen Aktivierungsphase, bewirkt aber später eine Restriktion der Population (Reinhardt et al., 2001). Es beeinflusst die Vasoregulation und vaskuläre Permeabilität und führt bei Überproduktion zu Fieber, Sepsis und Kachexie. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. IL-4 führt insbesondere zur IgE-Produktion in den B-Zellen, während IL-5 das wichtigste Zytokin ist, welches eosinophile Granulozyten aktiviert. Somit sind die Th2-Zellen in allergischen Reaktionen und im Kampf gegen parasitäre Infektionen beteiligt. Th2-Zellen leisten entscheidende T-Zell-Hilfe zur B-Zell-Aktivierung und Produktion von IgM und IgG-Antikörpern (Janeway et al., 1988; Mosmann et al., 1986).

In einem IL-23-, IL-1- und IL-6-reichen Milieu entstehen aus aktivierten T-Zellen Th17-Zellen, die für die frühe adaptive Immunantwort verantwortlich sind. Die Th17-Zellen aktivieren neutrophile Granulozyten. Außerdem zeichnen sie sich durch Produktion von IL-17 aus, welches für den Schweregrad bestimmter Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis, verantwortlich gemacht wird (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011; Roeleveld and Koenders, 2015). Neben den genannten drei Subpopulationen von Effektorzellen sind in der Literatur auch regulatorische T-Zellen beschrieben, die sich in Präsenz von TGF $\beta$  und IL-2 entwickeln und die T-Zell-Antwort supprimieren. Diese Zellen sind neben den natürlichen regulatorischen T-Zellen, welche im Thymus entstehen, für Toleranzentwicklung und Vermeidung von Autoimmunität von enormer Bedeutung (Ohkura et al., 2013).

## 1.2. T-Zell-Aktivierung

Naive T-Zellen, also solche, die noch keinen Antigenkontakt hatten, sind als kleine Zellen mit dicht gepacktem Chromatin, wenig Zytoplasma und niedriger RNA- und Proteinsynthese zu erkennen und sind primär in der kortikalen Zone sekundärer lymphatischer Organe (Lymphknoten, Payersche Plaques, Tonsillen, Milz) zu finden (Bredley, 1996; Merica et al., 2000). Sie exprimieren Oberflächenmoleküle, wie CD62L oder CCR7, die als Liganden der Rezeptoren an den hochendothelialen Venolen der sekundären lymphatischen Organe binden und somit als Migrations- und Homingfaktoren fungieren (Campbell and Butcher, 2000). Durch Bindung an aktivierte professionelle APCs, vor allem an dendritische Zellen in den T-Zell-Regionen (Steinman et al., 1997), kommt es zu einer Interaktion zwischen mehreren MHC-Molekülen der APCs und den T-Zell-Rezeptoren. In den meisten Fällen wird das Antigen, für das der T-Zell-Rezeptor spezifisch ist, nicht erkannt und die T-Zelle trennt sich von der antigenpräsentierenden Zelle und migriert weiter. Wird der Antigen-MHC-Komplex erkannt, kommt es zu einer strukturellen Veränderung der Adhäsionsmoleküle, unter anderem des LFA-1 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten und ihre Affinität zu Liganden, wie ICAM oder DC-SIGN, auf der Oberfläche der APCs steigt. Dies erlaubt eine etwa 24 Stunden andauernde Bindung zwischen der antigenspezifischen T-Zelle und der APC (Henrickson et al., 2008).

Einen Tag nach Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes auf den dendritischen Zellen kommt es zur Proliferation des Lymphozyten, wobei die Tochterzellen ebenfalls an die APC gebunden bleiben. In der Literatur wird eine Zunahme der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen drei bis sieben Tage nach Antigen-Injektion beschrieben. Bereits kurz nach dem Peak der Expansionsphase folgt eine Reduktion von aktivierten T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen, was eine unkontrollierte Expansion von Lymphozyten verhindert, wobei der genaue molekulare Mechanismus des Zelltodes bislang unklar bleibt (Zajac et al., 1998).

Die Aktivierung naiver T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen werden durch eine Reihe von Signalen kontrolliert. Diese sind in der Literatur als Signal 1, 2 und 3 zusammengefasst. Als Signal 1 wird die Interaktion zwischen dem Antigen-MHC-Komplex auf den APCs und dem T-Zell-Rezeptor bezeichnet. Signal 1 allein ist jedoch für das Überleben, die klonale Expansion und die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen nicht ausreichend. Damit die antigenspezifischen T-Zellen überleben und sich teilen können brauchen sie zusätzliche Signale. Diese werden als Signal 2 bezeichnet. Dazu gehört der Kontakt zwischen den B7-Molekülen auf den APCs und CD28 auf den Lymphozyten. Die Bindung zwischen B7 und CD28 führt zur Translokation der Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB, welche die Transkriptionsrate des IL-2-Gens erhöhen (Lai et al., 1995). Andererseits wird die mRNA durch das CD28-Signal stabilisiert

(Lindstein et al., 1989). Durch diese beiden Effekte steigt die IL-2-Produktion um etwa das 100-fache an (Umlauf et al., 1995). Daneben wird durch die B7-CD28-Bindung die IL-2-Rezeptoraffinität gesteigert, was den Übergang der Zelle von der Ruhephase in die G1-Phase des Zellzyklus als Konsequenz hat. Als Signal 3 wird der Zytokinkontext während der Antigenpräsentation zusammengefasst. Zytokine, wie IL-1 und TNF $\alpha$ , werden von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise Makrophagen, im Rahmen einer entzündlichen Reaktion sezerniert und führen wiederum zu einer Verstärkung von Signal 2 (Curtsinger and Mescher, 2010).

Außer CD28 dienen zahlreiche andere Moleküle als kostimulierende Signale der T-Zell-Aktivierung. Darunter ist ICOS, ein homodimeres Protein, den der auf dendritischen Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten exprimierte Ligand LICOS bindet. ICOS verbessert die T-Zell-Antwort gegenüber Fremdanitigenen, stimuliert die Proliferation und Lymphokinexpression der T-Zellen und optimiert ihre B-Zell-Hilfe (Mahajan et al., 2007). Obwohl ICOS zur CD28 Familie gehört erhöht es nicht die IL-2 Produktion, sondern ist mit der Synthese von IL-10 verbunden, einem B-Zell-Differenzierungsfaktor (Lohning et al., 2003). Auch CTLA-4 gehört zur Familie der T-Zell-Regulatoren, ist aber eher an der Kontrolle der Proliferation beteiligt. Es ist gezeigt worden, dass der Verlust von CTLA-4 zur massiven Vermehrung der Lymphozyten und letalen Organdestruktion durch Autoimmunität führt (Tivol et al., 1995).

Auch Moleküle der TNF-Familie, wie CD27 und CD40, sind an der Regulierung der T-Zell-Aktivierung beteiligt. Das auf dendritischen Zellen exprimierte CD40 bindet an den CD40-Ligand der T-Zellen und schickt zweierlei Signale. Aktivierende Signale der T-Zelle auf der einen Seite und Signale zur Expression von B7 auf den APCs auf der anderen Seite. Die Interaktion von CD40 und CD40L wird in der Literatur als essentiell für die B-Zell-Hilfe beschrieben. Durch die Bindung können B-Zellen aktiviert und zur Produktion von Immunglobulinen verleitet werden. Maxwell et al. konnten zeigen, dass eine in vivo Applikation von anti-CD40 2 Tage vor Antigeninjektion zu einer dreifachen Zunahme der CD4-Expansion und einer späteren Deletion von aktivierten T-Helferzellen führte (Maxwell et al., 1999).

### **1.3. T-Zell-Differenzierung zu Gedächtniszellen**

Nach einer Infektion und Aktivierung der spezifischen T-Zellen durch die APCs kommt es zu einer bis zu 50000-fachen Expansion spezifischer T-Zell-Klone. Effektorzellen, Zellen also, die durch APCs aktiviert wurden, unterscheiden sich sowohl phänotypisch als auch funktionell von naiven Zellen. Oberflächenmarker wie CD44, CD69 oder LFA-1 werden hoch-, andere, wie

CD62L und CD45RB, herunterreguliert. Sowohl CD4<sup>+</sup>, als auch CD8<sup>+</sup> Effektorzellen sezernieren sogenannte Effektorlymphokine: IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5. Auch Zytokine wie IL-2 und TNF $\alpha$  werden schneller, nach einem geringeren Antigenstimulus und in höheren Mengen als durch naive Zellen sezerniert (Sallusto et al., 2004). Nachdem die Infektion erfolgreich bekämpft und das Pathogen eliminiert ist, sterben 90-95% der Effektorzellen (Wiesel et al., 2009). Die bleibenden Gedächtniszellen können sehr lange überleben und bieten einen dauerhaften Schutz vor Reinfektion. Die Anzahl der Gedächtniszellen im Körper ist deutlich höher als die der naiven T-Zellen gleicher Spezifität, sie sind ubiquitär anzutreffen und besitzen die Fähigkeit, in kurzer Zeit nach Antigenkontakt Effektorfunktionen zu aktivieren (Sallusto et al., 2004). Die Homeostase dieser Zellpopulation erfolgt antigenunabhängig, die Zellen flutieren nach ihrer Entstehung in den sekundären lymphatischen Organen und Geweben und proliferieren langsam in Anwesenheit von IL-7 und IL-15 (Kondrack et al., 2003; Shin et al., 2007; Williams and Bevan, 2007). Lanzavecchia et al. haben eine Differenzierung zwischen effector memory (T<sub>EM</sub>) und central memory T-Zellen (T<sub>CM</sub>) eingeführt. Die Ersten befinden sich in Geweben und üben dort nach Antigenkontakt Effektorfunktionen aus, während die Letzteren in sekundären lymphatischen Organen nachweisbar sind und nach Antigenstimulation rasch proliferieren und sich zu Effektorzellen entwickeln können (Sallusto et al., 2004). Die Verteilung dieser zwei Subtypen ist unter T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen unterschiedlich, unter den Ersten überwiegen die T<sub>CM</sub>, unter den Zweiten hingegen die T<sub>EM</sub>. Interessanterweise exprimieren T<sub>CM</sub> CCR7 und CD62L auf ihrer Oberfläche, welche als Homingfaktoren für sekundäre lymphatische Organe fungieren und auch auf naiven Zellen anzutreffen sind (Sallusto et al., 2004). Lange Zeit wurde vermutet, dass CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen ausschließlich in Blut und Lymphe zirkulieren. Tokoyoda et al. konnten 2009 zeigen, dass sie auch im Knochenmark zu finden sind und dass Ly6C solche Gedächtniszellen markiert (Tokoyoda et al., 2009).

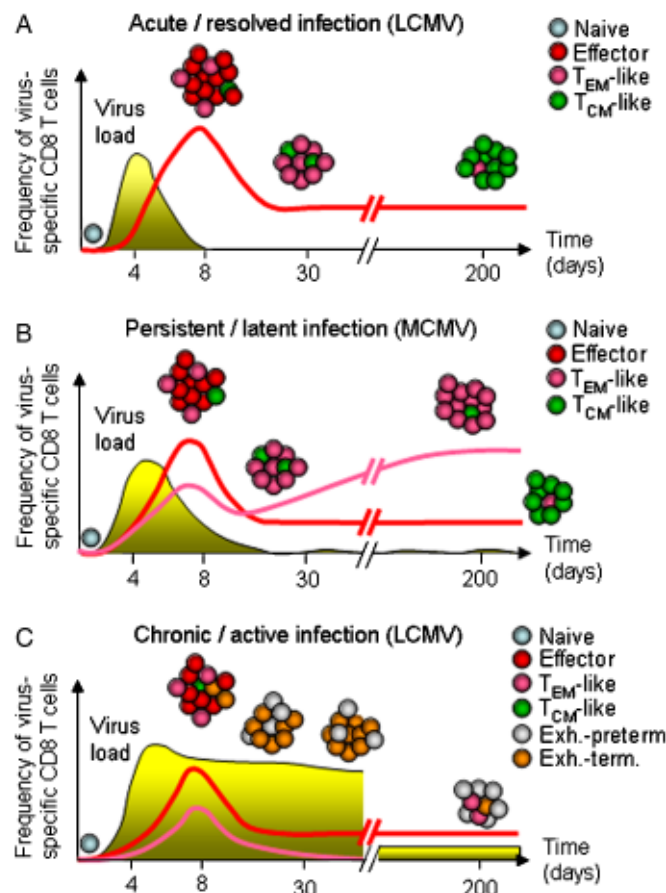
#### **1.4. T-Zell-Antwort während akuter und chronischer Infektionen**

Infektionen können nach ihrem zeitlichen Verlauf in transiente (akute) und persistente (chronische) Infektionen unterschieden werden. Bei einer transienten Infektion kommt es meist zu einem mehr oder minder schweren, zeitlich jedoch begrenzten Krankheitsverlauf. Als Erreger meist akut verlaufender viraler Infektionen im Menschen können an dieser Stelle Influenza- und Parainfluenzaviren, Rhino- und Pockenviren, das Rötelnvirus, das Gelbfieber- oder das Hepatitis A Virus (HAV) genannt werden. Während der akuten Krankheitsphase mit hoher Antigenlast kommt es nach primärer Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen zu ihrer Expansion und einer

starken Effektorzellantwort mit Zytokinfreisetzung, Fieber und erhöhter vaskulärer Permeabilität. Genexpressionsanalysen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen während akuter Infektionen mit dem murinen Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), einem Virus der Familie der Arenaviridae, das in Nagetieren zu Allgemeinstörungen (struppiges Fell, Konjunktivitis, Abmagerung), aber auch zentralnervösen Symptomen (Lähmung und Krämpfe) führen kann, zeigen, dass während dieser Zeit vor allem Gene die für Zytotoxizität, Sekretion antiviraler Zytokine, Chemokine und der Telomerase-Aktivität kodieren, hochreguliert werden (Kaech et al., 2002). Das führt dazu, dass die Infektion innerhalb kurzer Zeit eingedämmt und das Pathogen eliminiert wird, wobei B-Zellen, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems für die Bekämpfung viraler Infektionen verantwortlich sind (Homann et al., 2001; Oxenius et al., 1998). In persistierenden Infektionen überlebt das Pathogen oft jahre- bis lebenslang im Wirt. Bei einer Infektion mit Erregern mit einer hohen Replikations- und Mutationsrate, wie beispielsweise dem HI-Virus, kommt es meist, dank immer neuer Antigenmuster, zur Immunevasion und einem chronisch-aktivem Verlauf, gleichzeitig führt die Infektion mit HIV, HBV oder HCV, zu einer funktionellen Beeinträchtigung der spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Sinne einer T-Zell Erschöpfung (Gruener et al., 2001; Horiuchi et al., 2014; Kostense et al., 2002). Ein latenter Krankheitsverlauf ist mit einer chronisch niedrigen Antigenlast assoziiert. Hierziehen sich die Erreger in für das Immunsystem schwer zugängliche Organe zurück und werden unter Immunsuppression reaktiviert. Darunter können Viren mit nahezu 100% Durchseuchungsrate in der adulten Population, wie HSV, CMV und EBV, genannt werden (Walton et al., 2013; Wiesel et al., 2009). Einen ähnlichen Verlauf zeigt auch die murine MCMV-Infektion (Walton et al., 2013). In latenten Infektionen mit EBV oder CMV sind nahezu keine Veränderungen des adaptiven Immunsystems zu verzeichnen (Frebel et al., 2010; Pantaleo and Harari, 2006; Virgin et al., 2009). Ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Auswirkung akuter und chronischer Infektionen auf das adaptive Immunsystem ist das murine Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV). Bei einer Infektion von immunkompetenten Mäusen mit LCMV-Stämmen Klon 13 oder Docile kommt es zu einer protrahierten kontrollierten, d.h. chronisch aktiven, zwei bis vier Monate andauernden viralen Infektion (Ahmed et al., 1984; Althage et al., 1992; Wherry et al., 2003). Im Gegensatz zu Klon 13 und Docile wird der LCMV-Stamm Armstrong innerhalb von acht Tagen nach Infektion von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen fast vollständig eliminiert (Ahmed et al., 1984; Wherry et al., 2003). Er ist damit ein Model für eine akut verlaufende Infektion. In Infektionsmodellen mit Klon 13 können Auswirkungen einer chronisch hohen Antigenlast auf den Phänotyp spezifischer T-Zellen beobachtet und mit akuten Infektionen mit Stamm Armstrong verglichen werden. Dabei unterscheiden sich Klon 13 und Stamm Armstrong nur in zwei

Aminosäuren voneinander, weshalb alle bekannten T-Zell-Epitope gleich bleiben (Matloubian et al., 1990). Am Beispiel der viralen Infektion mit LCMV Typ Armstrong betrachtet vergehen von der Infektion bis zur vollständigen Elimination des Virus acht bis zehn Tage (Wiesel et al., 2009). Das Expansionsmaximum antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in diesem Modell am Tag acht post infectionem zu beobachten, worauf eine Kontraktionsphase folgt, welche nur etwa 5% der Zellen überleben (Wiesel et al., 2009). Durch Bildung dieser Gedächtniszellen bleibt der Wirt dauerhaft gegen Reinfektionen immun (Belz et al., 2000; Gaucher et al., 2008; Jameson and Masopust, 2009; Miller et al., 2008; Williams and Bevan, 2007). In der frühen Gedächtniszellphase (um den Tag 30) zeigen die zytotoxischen T-Zellen einen effector-memory Phänotyp (T<sub>EM</sub>), während in der späten Phase (> 200 Tage) vorwiegen Zellen mit central-memory Phänotyp (T<sub>CM</sub>) zu finden sind (Wiesel et al., 2009).

Ähnlich verläuft die T-Zell-Antwort während chronisch latenter Infektion mit MCMV mit einer Expansionsphase mit Maximum am sechsten bis achten Tag und darauf folgender Kontraktionsphase, sowie Bildung von Gedächtniszellen vom effector-memory Typ, welche weiter proliferieren und vom central-memory Typ, die nicht proliferieren. Es kommt jedoch nie zu einer kompletten Viruselimination aus dem Körper, das Virus persistiert in manchen Organen, was zu regelmäßigen Reinfektionen führt (Wiesel et al., 2009). Während einer chronisch-aktiven Infektion, beispielsweise mit LCMV Klon 13 oder Docile, bleibt die Antigenlast chronisch, es bilden sich keine Gedächtniszellen, sondern CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einem erschöpftem Phänotyp, welche einen hohen Umsatz und insgesamt numerisch schrumpfen oder ganz verschwinden können (Wiesel et al., 2009).



**Abb. 1. der Einleitung. Viruslast, dynamischer Verlauf der Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Zusammensetzung der T-Zell-Population während A. akuter Infektionen, B. latenter persistierender Infektionen, C. aktiver chronischer Infektionen (aus Wiesel et al., 2009).**

### 1.5. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung im Mausmodell

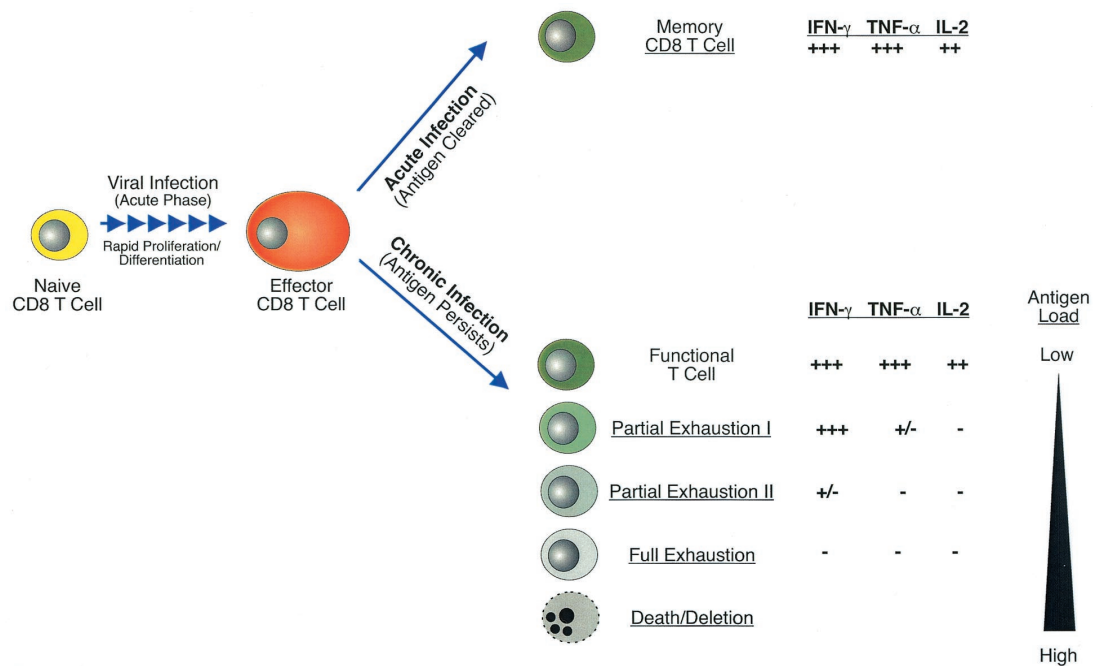
Die T-Zell-Erschöpfung wird in der Literatur als eine funktionelle Beeinträchtigung antigenspezifischer T-Zellen in einem Setting der chronischen Antigenpersistenz, welche weit über der Effektorphase hinausreicht, beschrieben (Pauken and Wherry, 2015; Wherry, 2011).

Dieses Phänomen der Dysfunktion spezifischer T-Zellen, das zur klonalen Deletion spezifischer T-Zellen führen kann, wurde erstmals in einem murinen Infektionsmodell mit LCMV beobachtet (Moskophidis et al., 1993a). Die Arbeitsgruppe von Moskophidis et al. infizierte erwachsene Tiere mit unterschiedlichen Dosen von LCMV Stamm Docile und stellte fest, dass Tiere, die mit 10<sup>2</sup> plaque forming units (PFU) LCMV infiziert wurden, eine regelrechte Antwort der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) zeigten, in vitro restimulierbare CTL-Vorläuferzellen produzierten und sich zwischen Tag 15 und 30 post infectionem von dem Virus befreiten, so dass keine Viren in Thymus oder Milz nachgewiesen werden konnte. Eine Infektion mit 10<sup>7</sup> PFU induzierte eine schwache CTL-Antwort, die CTL-Vorläuferzellen, welche am Tag 6 post infectionem noch

messbar waren, verschwanden am Tag 12. In diesem Modell kam es zu einer Viruspersistenz in allen Organen, die über 280 Tagen nach der Infektion nachweisbar war (Moskophidis et al., 1993b).

Seit der Entdeckung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung durch Moskophidis et al. bleibt die chronische Infektion der Maus mit LCMV ein beliebtes Modell zur Untersuchung dieses Phänomens. Wie im Kapitel 1.4. erläutert verursachen unterschiedliche Stämme dieses Virus verschiedene Krankheitsverläufe und erlauben somit einen phänotypischen und funktionellen Vergleich spezifischer Zellen während eines akuten, chronisch latenten und eines chronisch aktiven Krankheitsverlaufs. Eine protrahierte aktive Infektion mit LCMV führt zu einer Suppression der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort (Ahmed et al., 1984; Matloubian et al., 1990) und zur funktionellen Beeinträchtigung der Lymphozyten und schließlich ihrer klonalen Elimination (Wherry et al., 2003; Zajac et al., 1998; Zhou et al., 2002). Der Verlust der Effektorfunktionen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der LCMV-Infektion verläuft schrittweise und progressiv, der Schweregrad der Erschöpfung hängt von der Höhe der Viruslast ab (Fuller and Zajac, 2003; Wherry, 2011; Wherry et al., 2003; Zajac et al., 1998). Es wird ein fortschreitender Funktionsverlust über die Zeit beschrieben (Frebel et al., 2010; Wherry et al., 2007). Eine funktionstüchtige CD8<sup>+</sup> T-Zelle ist im Stande, Zytokine wie IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , zu produzieren. Während einer chronischen LCMV-Infektion verliert sie zunächst die Fähigkeit zur IL-2 Sekretion, schneller Proliferation und ex-vivo Toxizität, während die TNF $\alpha$ -Produktion reduziert ist; dieses kann man als Stadium I der Erschöpfung ansehen. Im nächsten Schritt kommt es zu einer Störung der TNF $\alpha$ -Produktion und Reduktion des IFN $\gamma$  (Stadium II), im Stadium III ist auch die IFN $\gamma$ -Sekretion nicht mehr vorhanden, man spricht von einem vollen Grad der Erschöpfung. In höheren Stadien ist die auch die Degranulation der Zellen beeinträchtigt. Bei höherer Viruslast kommt es zu klonaler Deletion spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Wherry et al., 2003).





**Abb. 2 der Einleitung. Ein Modell des hierarchischen Verlustes der T-Zell-Funktionen während chronischer viraler Infektionen (aus Wherry et al., 2003).**

Gedächtniszellen teilen sich nach einer akuten Infektion langsam, homogen und antigenunabhängig, für den Erhalt der Population sind in dieser Phase IL-7 und IL-15 essentiell (Shin et al., 2007; Surh and Sprent, 2008).

Auf erschöpften  $CD8^+$  T-Zellen jedoch werden die IL-7- und IL-15-Rezeptoren herunterreguliert, womit die Zellen auf das Antigen als Proliferationstrigger angewiesen sind. Die Unfähigkeit, antigenunabhängig zu proliferieren wurde durch folgendes Experiment illustriert: transferiert man erschöpfte T-Zellen adoptiv in einen gesunden, d.h. antigenfreien Empfänger, teilen sie sich nicht (Shin et al., 2007; Wherry et al., 2003). Insgesamt geht auch die Homogenität der Teilung verloren, d.h. es entwickeln sich zwei Subpopulationen, eine sich nicht teilende und eine, die eine sehr rasche Proliferation aufweist und für den Erhalt des Zellbestands sorgt (Paley et al., 2012; Shin et al., 2007).

## 1.6. $CD8^+$ T-Zell-Erschöpfung im Menschen

Vieles, was man über die  $CD8^+$  T-Zell-Erschöpfung aus dem LCMV-Mausmodell gelernt hat, kann man in multiplen anderen Tiermodellen und während chronischer viraler (SIV, HIV, HBV, HCV), bakterieller (Leishmaniose) und parasitärer Infektionen (*Shistosoma mansoni*), sowie Krebserkrankungen im Menschen beobachten (Gautam et al., 2014; Goepfert et al., 2000; Gruener

et al., 2001; Jin et al., 1999; Kostense et al., 2001; Lechner et al., 2000; Lee et al., 1999; Reignat et al., 2002; Shankar et al., 2000; Taylor et al., 2009; Virgin et al., 2009) .

In der frühen Phase einer Infektion mit dem HI-Virus sind eine Vielzahl von  $CD8^+$  Zellen, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind, nachweisbar. Damit kann der initiale Anstieg der Viruslast kontrolliert, jedoch nicht vollständig aus dem Körper eliminiert werden (Pantaleo et al., 1997). Grund dafür sind Immunevasionsmechanismen des Virus, wie Mutationen im viralen Genom, welche die Antigenerkennung erschweren, virale Latenz (McCune, 1995), Verhinderung der Antigenpräsentation auf den infizierten Zellen durch Herunterregulation von MHC-I Molekülen (Ploegh, 1998), sowie die Erschöpfung der  $CD8^+$  T-Zellen. Während der Phase der chronischen Antigenpersistenz verlieren die initial polyfunktionalen zytotoxischen T-Zellen, welche gleichzeitig  $TNF\alpha$ , IL-2,  $IFN\gamma$  und MIP-1 produzieren sowie CD107a, einen Marker für T-Zell-Degranulation auf der Zelloberfläche tragen, nach und nach Ihre Funktionsfähigkeit. Sie produzieren weniger Zytokine (Shankar et al., 2000) und zeigen sowohl eine gestörte zytotoxische Aktivität, als auch ein gestörtes Proliferationsverhalten. Zudem werden die Oberflächenmarker, wie beispielsweise das PD-1 hochreguliert und andere wie das CD127 herunterreguliert. Insgesamt verlieren die T-Zellen ihre Polyfunktionalität: die Anzahl monofunktionaler Zellen steigt mit der Zeit signifikant an (Betts et al., 2006; Streeck et al., 2008). Gleichzeitig führt eine chronische Viruspersistenz zum Verschwinden spezifischer  $CD8^+$  T Zellen (Pantaleo et al., 1997). Während einer akuten Infektion mit Hepatitis B Virus sind spezifische  $CD8^+$  T-Zellen gegen multiple Epitope des HBV nachweisbar: sie proliferieren und bekämpfen das Virus durch Produktion von  $IFN\alpha$  und  $IFN\gamma$ , sowie Granzymen und Perforinen (Thimme et al., 2003). Mit chronischer Antigenpersistenz finden phänotypische Unterschiede in diesen Zellen statt: es werden inhibitorische Moleküle wie PD-1, CTLA-4, 2B4 und TIM-3 auf ihrer Oberfläche hochreguliert (Blackburn et al., 2009; Boni et al., 2007; Raziorrouh et al., 2010; Su and Schneider, 1997). Diese Zellen produzieren weniger IL-2, die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  bleibt erhalten und die Hepatitis persistiert (Bertoletti and Maini, 2000; Das et al., 2008; Su and Schneider, 1997).

Anders verhalten sich  $CD8^+$  Zellen in chronischen Infektionsverläufen mit Hepatitis C Virus; diese produzieren insgesamt zunehmend weniger  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$ , bis schließlich die  $IFN\gamma$ -Sekretion gänzlich ausfällt und es zur klonalen Deletion antigenspezifischer T-Zellen kommt (Bowen and Walker, 2005; Gruener et al., 2001; Lechner et al., 2000).

### 1.7. Zusammenfassung: Erschöpfung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Obwohl das Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung antigenspezifischer T-Zellen von Pathogen zu Pathogen variiert, konnten in den letzten Jahren gemeinsame Züge phänotypischer und funktioneller Veränderungen erschöpfter antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Maus und im Menschen identifiziert werden.

Dazu gehören:

- Der allmähliche Verlust der Effektorfunktionen nach Zellaktivierung und Priming (Zajac et al., 1998),
- Expression multipler inhibitorischer Rezeptoren und Moleküle auf der Zelloberfläche erschöpfter Zellen (Wherry, 2011; Wherry et al., 2007),
- Suppression aktivierender Moleküle (Crawford et al., 2014),
- Nachlassen der Produktion der Effektorzytokine wie TNF $\alpha$ , IL-2 und IFN $\gamma$  (Wherry et al., 2007),
- beeinträchtigte ex-vivo Toxizität der erschöpften T-Zellen im Vergleich zu Effektorzellen (Wherry et al., 2007),
- Korrelation des Schweregrads der Erschöpfung mit der Schwere der Infektion (Wherry et al., 2007),
- Antigenabhängiges Überleben und vermindertes Ansprechen auf IL-7 und IL-15 (Shin et al., 2007)
- metabolische Unterschiede erschöpfter Zellen im Vergleich zu Effektor- und Gedächtniszellen (Wherry et al., 2007),
- Änderung der Transkription (Crawford et al., 2014)
- Änderung des Aktivierungsprofils der Transkriptionsfaktoren in erschöpften T-Zellen (Crawford et al., 2014; Pauken and Wherry, 2015).

Dennoch sind erschöpfte T-Zellen funktionell nicht völlig inert und leisten ihren Beitrag zur Infektionskontrolle. Darauf kann man aus dem folgenden Beispiel schließen: In mit SIV infizierten Primaten führt die Depletion erschöpfter virusspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum Anstieg der Viruslast und der Passage ins AIDS-Stadium (Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999).

Indirekt zeigt die kontinuierliche Mutation der viralen T-Zellepitope in chronischen Infektionen, welchen Selektionsdruck erschöpfte T-Zellen auf Viren ausüben (Blattman et al., 2009; Jamieson et al., 2003). So findet man beispielsweise Varianten von bestimmten viralen T-Zell-Epitopen bei HIV-Erkrankten auch nur dann, wenn es auch für das Epitop spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gibt und eine entsprechende Immunantwort stattfindet. Fehlen die für ein Epitop spezifische T-Zellen, so bleiben auch die Mutationen aus (Jamieson et al., 2003). Der Zustand der funktionellen

Erschöpfung scheint zumindest eine Zeit lang reversibel zu sein, anschließend geht die Fähigkeit, sich zu Gedächtniszellen zu entwickeln, verloren (Angelosanto et al., 2012).

### **1.8. CD4<sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung in der Maus**

Die Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist für die Kontrolle einer Infektion entscheidend. Das Spektrum von Funktionen der CD4<sup>+</sup> T-Zell reicht von CD8<sup>+</sup> T-Zell- und B-Zell-Hilfe bis zur Ausübung direkter antiviraler Effektorfunktionen: Kontrolle der viralen Replikation und Reaktivierung, sowie der Morbidität und der Mortalität des Wirtes (Walton et al., 2013). Dabei scheint die CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunität insbesondere bei der Kontrolle chronisch latenter Infektionen mit Herpesviren, EBV und CMV im Menschen oder MCMV der Maus (Jonjic et al., 1990) eine wichtige Rolle zu spielen. Dies erklärt warum bei HIV-positiven Patienten mit reduzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Zahlen häufiger unkontrollierte Reaktivierungen dieser Viren auftreten und warum sie häufiger an HSV-assoziierten Krankheitssymptomen, Burkitt-Lymphom oder CMV-Retinitis leiden (Komanduri et al., 1998; Parisi et al., 2011; Sebelin-Wulf et al., 2007). Auf der anderen Seite führt der Transfer antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> Zellen in immunsupprimierte Individuen mit akuter Reaktivierung einer CMV-Infektion zu einer Reduktion der Viruslast (Einsele et al., 2002). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit Viren, die einen chronisch latenten Verlauf zeigen, ist bei Fehlen einer regelrechten CD4<sup>+</sup> T-Zell Immunität höher als in Abwesenheit einer CD8<sup>+</sup> T-Zell vermittelten Antwort (Carneiro-Sampaio and Coutinho, 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Krankheitsverlauf von EBV-bedingten Erkrankungen, wie einer PTLD-ähnlichen Erkrankung oder des Burkitt-Lymphoms, auch in Abwesenheit von CD8<sup>+</sup> Zellen durch die CD4<sup>+</sup> Zellen kontrolliert werden kann (Fu and Cannon, 2000; Merlo et al., 2010). Im LCMV-Infektionsmodell kam es in Abwesenheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Verstärkung der chronischen Infektion (Wiesel and Oxenius, 2012). Wenn hingegen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in infizierte Tiere adoptiv transferiert wurden, wurden erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Zellen wieder reaktiviert (Aubert et al., 2011). Der Verlauf der CD8<sup>+</sup>- und der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Erschöpfung erschien im LCMV-System zunächst ähnlich, allerdings ist die Erschöpfung virusspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen kaum unabhängig von der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung zu beschreiben: bleibt die regelrechte Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen während einer chronischen Infektion erhalten, kann eine CD8<sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung verhindert werden (Brooks et al., 2006). Analog zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen verlieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen während chronisch aktiver Infektionen mit LCMV ihre Fähigkeit Effektorzytokine wie IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  zu produzieren (Brooks et al., 2005; Fuller et al., 2004; Fuller and Zajac, 2003; Oxenius et

al., 1998). Zudem werden Gene, die für inhibitorische Moleküle, wie PD-1, 2B4, LAG3, BATF, Blimp-1, kodieren, ähnlich wie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aktiviert (Shin et al., 2009; Wherry et al., 2007). Fahey et al. zeigten, dass CD4<sup>+</sup> während chronisch aktiven Infektion mit LCMV unter Einfluss von IL-6 und Aktivierung von BCL6 zu follikulären T-Helferzellen differenzieren (Fahey et al., 2011). Diese bleiben vor allem in Keimzentren und unterstützen dort die humorale Immunantwort. Somit herrscht momentan kein Konsens, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen so zuverlässig als „erschöpft“ zu bezeichnen sind wie es für CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Fall ist.

### **1.9. CD4<sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung im Menschen**

Viele Erkenntnisse über die Erschöpfung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> Zellen, die aus dem Mausmodell gewonnen wurden, können auch auf chronisch aktive Infektionen im Menschen angewandt werden. In der HIV-Infektion fallen der Anstieg der Viruslast und Krankheitsprogress mit dem Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeitlich zusammen. So sinkt die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> Zellen mit der Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kostense et al., 2002). Während der HCV-Infektion führt eine adäquate CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort zur viralen Kontrolle und schließlich zur Heilung - die funktionelle Beeinträchtigung der antigenspezifischen T-Helferzellen hingegen zur Erhöhung der Viruslast (Schulze Zur Wiesch et al., 2012).

Auf der einen Seite bestehen vielzählige Analogien zwischen erschöpften CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen: während der LCMV-Infektion fällt eine konsekutive Reduktion von IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  durch die erschöpften CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf (Fuller and Zajac, 2003). Dieser dysfunktionale Zustand, mündet analog zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der klonalen Deletion. In der chronischen HCV-Infektion fällt neben einer Reduktion der Zytokinsekretion und der Proliferation eine Hochregulation von inhibitorischen Molekülen, wie PD-1 und Tim-3, und die sinkende Anzahl antigenspezifischer T-Helferzellen auf. Ähnliche phänotypische und funktionelle Veränderungen der CD4<sup>+</sup> Zellen zeigen sich während der HIV-Infektion, allerdings werden die inhibitorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4 hochreguliert. Sowohl erschöpfte CD8<sup>+</sup> wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen regulieren die Transkriptionsfaktoren BATF, Tbx, PRDM1, Eomes herauf (Crawford et al., 2014; Wherry, 2011).

Auf der anderen Seite gibt es grundlegende Unterschiede auf phänotypischer und Transkriptionsebene zwischen erschöpften CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Infektionsmodell mit LCMV Klon 13 entwickeln die CD4<sup>+</sup> T-Zellen den erschöpften Phänotyp im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht konsekutiv, sondern es kommt zu einer relativ früh einsetzenden schweren Erschöpfung (Crawford et al., 2014). Erschöpfte CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren zwar weniger

Effektorzytokine im Vergleich zu Effektor- und Gedächtniszellen dafür um so mehr IL-10 und IL-21 (Brooks et al., 2006; Ejrnaes et al., 2006; Elsaesser et al., 2009), wobei insbesondere IL-21 als Zytokin der folliculären Helferzellen beschrieben wurde (Crotty, 2011). Zudem tauchen während chronischer Infektionen IL-10 und IFN $\gamma$  koproduzierende Zellen auf (Brooks et al., 2006). Die erschöpften CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden sich im Spektrum der exprimierten inhibitorischen Rezeptoren. Während in CD8<sup>+</sup> T-Zellen Gene für CD244, Tim-3, Lilbr4, und 2B4 hochreguliert sind, werden in CD4<sup>+</sup> T-Zellen Gene für CTLA-4, CD200, BTLA aktiviert. LAG3 und PD-1 findet man gleichermaßen in CD4<sup>+</sup> wie auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Crawford et al., 2014).

Auch das Spektrum kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche erschöpfter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen unterscheidet zwischen den beiden Lymphozytengruppen. So exprimieren erschöpfte CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt OX40 und ICOS mRNA, während CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt CD80 exprimieren (Crawford et al., 2014). Genomanalysen erschöpfter CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen deutliche Unterschiede in der Transkription im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Effektorzellen und Gedächtniszellen. So gibt es etwa 715 Unterschiede auf Transkriptionsebene zwischen naiven Zellen und erschöpften CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Crawford et al., 2014). Erschöpfte CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren vermehrt Transkriptionsfaktoren wie GATA3, BCL6 und Helios, Klf4, was erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht tun. Eomes wird auch nur von einer kleinen Population CD4<sup>+</sup> Zellen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor Tbet wird während der T-Zell Aktivierung hochreguliert, findet sich aber insgesamt seltener in erschöpften Zellen im Vergleich zu Gedächtniszellen findet. Wenn man bedenkt, dass eine erhöhte Aktivität von Tbet zur Suppression von PD-1 führt, wird klar warum erschöpfte Zellen vermehrt das inhibitorische Molekül PD-1 tragen (Crawford et al., 2014). Insgesamt unterscheiden sich die Transkriptionsprofile erschöpfter CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich zu Effektor- und Gedächtniszellen, jedoch nicht so stark wie zu den erschöpften CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Crawford et al., 2014).

### **1.10. Zugrunde liegende Mechanismen der Erschöpfung**

Die möglichen Ursachen der T-Zell-Erschöpfung werden in intrinsische und extrinsische unterteilt (Frebel et al., 2010).

Als extrinsische Ursachen der Erschöpfung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind der Anstieg inhibitorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF $\beta$  (Brooks et al., 2006; Tinoco et al., 2009) oder die fehlende CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe in Bezug auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung (Zajac et al., 1998), sowie eine erhöhte Aktivität der regulatorischen T-Zellen (Myers and Hasenkrug, 2009; Myers et al., 2009) genannt werden. Die Rolle regulatorischer T-Zellen als Ursache der Erschöpfung ist

kontrovers. Es ist bekannt, dass die Population der Tregs während einer chronischen Infektion deutlich kleiner als während einer akuten Infektion ist, jedoch nicht gänzlich fehlend wie im naiven Tier. Einerseits widerlegten Brooks et al. den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Funktionsverlust antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> im LCMV-Modell, gleichzeitig wurde die Suppression der CD8<sup>+</sup> Zellen durch Tregs in chronischen Infektionen mit Friends virus nachgewiesen (Brooks et al., 2005; Myers et al., 2009; Nair et al., 2011).

Die Inhibition der T-Zellen durch APCs wurde ebenfalls als mögliche Ursache der T-Zellerschöpfung diskutiert, wurde aber von Brooks et al. widerlegt. Die Autoren zeigten, dass antigenspezifische CD4<sup>+</sup> regelrecht stimuliert werden und keinerlei inhibitorisches Signal von den APCs erhalten (Brooks et al., 2005).

Als intrinsische Ursachen der T-Zell-Erschöpfung werden die Hochregulation inhibitorischer, und Herunterregulation kostimulatorischer Rezeptoren diskutiert, wobei das Kausalitätsverhältnis nicht ganz geklärt ist (Crawford and Wherry, 2009). Genexpressionsanalysen von Effektorzellen und erschöpften CD8<sup>+</sup> Zellen im murinen Infektionsmodell mit LCMV wiesen eine Reihe von Molekülen als Inhibitoren der nach (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009; Wherry, 2011). Einige dieser Moleküle, wie PD1, LAG3, 2B4, CTLA-4, PIR-B und GP-49, CD160 und TIGIT wurden vermehrt auf Lymphozyten im murinen Infektionsmodell mit LCMV, aber auch in Menschen mit HIV, Hepatitis B oder Hepatitis C Infektion oder bakteriellen Infektionen mit *M. tuberculosis* oder *Schistosoma mansoni* gefunden (Wherry, 2011).

Dabei ist beobachtet worden, dass die Menge und Vielfalt inhibitorischer Moleküle auf der Oberfläche mit dem Schweregrad der T-Zell-Erschöpfung und der Infektion korreliert (Blackburn et al., 2009). Ein Indikator für den Schweregrad der Erschöpfung ist die Koexpression mehrerer inhibitorischer Moleküle auf der Zelloberfläche. So sind Zellen, die mehr als einen inhibitorischen Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen, funktionell mehr beeinträchtigt als jene, die lediglich ein inhibitorisches Molekül exprimieren (Fourcade et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010). Interessanterweise werden nicht nur die inhibitorischen Rezeptoren auf den T-Lymphozyten hochreguliert, sondern auch entsprechende Liganden auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und im infiziertem Gewebe (Barber et al., 2006; Virgin et al., 2009).

PD-1 war eins der ersten Moleküle, welche mit T-Zell-Erschöpfung in Verbindung gebracht wurden. PD1, welches auf den CD8<sup>+</sup> Effektorzellen nur transient exprimiert wird, wird auf erschöpften T-Zellen selektiv hochreguliert und persistiert auf der Zelloberfläche (Barber et al., 2006). Gleichzeitig wird der PD-1 Ligand auf Makrophagen, hämatopoetischen Zellen und virusinfizierten Zellen hochreguliert. Eine Blockierung von PD-L1 führt zu einer Verstärkung der zytotoxischen T-Zell-Antwort, Proliferation antigenspezifischer Zellen und Reduktion der

Viruslast in einer LCMV-Infektion (Barber et al., 2006). Durch eine gleichzeitige Blockierung mehrerer inhibitorischer Rezeptoren wird dieser Effekt potenziert (Blackburn et al., 2009). Interessant ist, dass Knockouttiere, denen PD-L1 fehlt, eine chronische LCMV Infektion mit Klon 13 aufgrund einer immunologisch vermittelten Gewebsdestruktion nicht überleben (Barber et al., 2006). Somit scheinen PD-1 und sein Ligand für die Immunmodulation, Eingrenzung der Autoimmunität und die Unterstützung der Toleranz gegenüber Eigenantigenen während einer chronischen Infektion wichtig zu sein (Keir et al., 2008). Ähnlich verhält es sich auch mit inhibitorischen Zytokinen; so ist eine Blockierung des TGF $\beta$  mit Autoimmunität verbunden (Tinoco et al., 2009).

Es gibt auch zunehmend Hinweise darauf, dass der erschöpfte Phänotyp mit einer Veränderung der TCR-Signaltransduktion einhergeht.

Die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren wie Blimp-1, Batf, T-bet, Eomes, und NFAT wird ebenfalls für die Erschöpfung CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich gemacht (Agnellini et al., 2007; Kao et al., 2011; Paley et al., 2012; Quigley et al., 2010; Shin et al., 2007; Wherry et al., 2007). So weisen die Zellen eine verminderte Expression von Signaltransduktionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren, wie Cbl-b (Agnellini et al., 2007), Bim (Blackburn et al., 2009), Blimp-1 (Grayson et al., 2006), Spi-6 oder verminderte Translokation von NFAT-2 in den Nukleus auf (Agnellini et al., 2007).

Als eine weitere mögliche Ursache der T-Zell-Erschöpfung wird eine Veränderung im Metabolismus der Zellen und die energetische Insuffizienz genannt (Wherry et al., 2007). Genexpressionsanalysen erschöpfter CD8<sup>+</sup> Zellen im LCMV Klon 13 Infektionsmodell zeigten eine ausgeprägte Beeinträchtigung des Stoffwechsel und der Energiegewinnung. Dies geschieht zum einen dadurch, dass mehrere ribosomale Proteine auf Transkriptionsebene herunterreguliert werden. Die für den Zitratzyklus verantwortlichen Gene, werden in erschöpften Zellen runterreguliert, nicht aber in Effektor- oder Gedächtniszellen. Die Transkription von Ionenkanälen und Aquaporinen ist in erschöpften Zellen verändert (Wherry et al., 2007).

### **1.11. Rolle der Antigenlast bei der T-Zell-Erschöpfung**

Das Phänomen der T-Zell Erschöpfung ist häufig in Infektionsmodellen mit schnell replizierenden Viren, wie dem murinen LCMV oder HIV, HBV und HCV im Menschen untersucht. Die Infektion mit diesen Viren führt untherapiert zu einer hohen Antigenlast.

Dies könnte dadurch zustande kommen, dass eine hohe Anzahl von Zellen infiziert wird, viel Antigen präsentiert wird und letztendlich zur T-Zellerschöpfung führt. So infiziert LCMV eine



Vielzahl von hämatopoetischen und nicht-hämatopoietischen Zellen (Li et al., 2009; Mueller et al., 2007). Im HIV-Modell schreitet die T-Zell Erschöpfung langsamer voran, was man mit geringerer Dichte infizierter Zellen als in der LCMV-Infektion erklären könnte (Frebel et al., 2010). Der kausale Zusammenhang zwischen Antigenlast und Erschöpfung antigenspezifischer Zellen blieb lange unklar. Es spricht jedoch Einiges dafür, dass hohe Antigenlast zur T-Zell-Erschöpfung führt und nicht vice versa. Senkung der Antigenlast in Infektionen mit LCMV oder HIV führt teilweise zu Funktionsrückgewinn der Zellen (Streeck et al., 2008). In Infektion mit LCMV, in dem das virale Antigen lediglich auf hämatopoietischen Zellen präsentiert wird, kommt es später zur Beeinträchtigung der Zytokinproduktion (Mueller and Ahmed, 2009). In der Mauseinfektion mit Influenza A mit niedriger Antigenlast kam es zu einer erfolgreichen Immunantwort der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Elimination des Virus und einer Immunität gegen das Virus, wohingegen eine Infektion mit hoher Antigenlast zu letalem Ausgang führte (Moskophidis and Kioussis, 1998). Wiederholte Infektionen der Mäuse mit Influenza A führen lediglich zu einer leichten Beeinträchtigung der T-Zell Funktion (Bucks et al., 2009). Sogar wenn die Viruslast gleich bleibt führen die häufiger vorkommenden Epitope zu einer deutlicher ausgeprägten Erschöpfung spezifischer T-Zellen als die weniger häufig vorkommenden Epitope (Wherry et al., 2003). In persistierenden Infektionen mit HSV, CMV oder EBV, die mit einer niedrigen Antigenlast assoziiert sind, bleibt ein Funktionsverlust der T-Lymphozyten in der Regel aus (Hadrup et al., 2006; Sester et al., 2008; Wiesel et al., 2009).

Dies lässt vermuten, dass die Antigenlast unabhängig von Art des Erregers, seiner Pathogenität, Lokalisation oder Replikation entscheidend zur Erschöpfung beiträgt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Material und Versuchstiere

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
1,5 ml-Gefäße (“Eppis”)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2, 5, 10, 25, 50 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5, 14 ml Round-Bottom-Tube	BD Labware, Franklin Lakes, USA
50 ml Cellstar Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einstreu	Lignocell, Rettenmaier, Rosenberg
Electrophoresis Power supply, EPS 200	Amarsham, Freiburg, Deutschland
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
FACS Calibur Flow Cytometer	BD, San Jose, USA
FACS Röhrchen	Sartstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Millex-GP 0,22 µm	Merck Millipore, Billeria, USA
Filterspitzen 2-20 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Filterspitzen 20-1000 µl	Diagonal, Münster, Deutschland
Gel-Elektrophorese-Kammer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Injektionsspritzen 500 µl/1 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Light Cycler 480 Multiwell Platte 96	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS LS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Magnet	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	Velp Scientifica, Usmate, Italien
Mäusekäfige 440 cm <sup>2</sup> Typ BIOS SL	Integra Biosciences Fernwald
Nestwatte	Plexx, Elst, Niederlande
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipette Macro	Brand, Wertheim, Deutschland

Pipette Pipetboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipette Pipetman 0,2-2 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette Pipetman 2-20 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette Pipetman 200-1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette Pipetman 50-200 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 20-1000 µl	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank, HeraSafe	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Thermocycler Biometra	Biometra, Göttingen, Deutschland
Timer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transferpipette S-8 0,5-10 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
UV-Licht	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vortex Genie 2TM	Scientific Industries, N.Y., USA
Wasserbad MT/2	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellinkubator Type B5060 EC-CO <sup>2</sup>	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zellkulturtestplatte 24, 96 U	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb (Cell strainer) 70 µm	BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 46RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mecaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
5-Brom-2'-deoxyuridin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
Albumin Fraktion V	Diagonal, Münster, Deutschland
Betain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Brefeldin A	PAA, Cölbe, Deutschland
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CFDA-SE	invitrogen, Calsbad, USA
Chloroform	Diagonal, Münster, Deutschland
Cytofix Buffer	BD-Bioscience, San Diego, USA
DMEM (ohne Phenolrot)	PAA, Cölbe, Deutschland

DNase I	Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
dNTP	peqlab, Erlangen, Deutschland
Doxycyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
EDTA	Diagonal, Münster, Deutschland
Ethanol 99%	Diagonal, Münster, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland,
FBS	invitrogen, Calsbad, USA
Ficoll	PAA, Cölbe, Deutschland
Fixation Buffer	Biolegend, San Diego, USA
HEPES Buffer, IM	PAA, Cölbe, Deutschland
IMDM	PAA, Cölbe, Deutschland
Ionomycin-Calciumsalz	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAA, Cölbe, Deutschland
MCC	JPT Peptide Technologies, Berlin, Deutschland
MEM NEAA	PAA, Cölbe, Deutschland
Mineralwasser Volvic	Danone Waters, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10x)	PAA, Cölbe, Deutschland
PERM Buffer III Phosphoflow	BD-Bioscience, San Diego, USA
Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego, USA
Permeabilization Wash Buffer(10x)	Biolegend, San Diego, USA
Pharm Stain Buffer	BD-Bioscience, San Diego, USA
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Diagonal, Münster, Deutschland
Proteinase K	Diagonal, Münster, Deutschland
RPMI	PAA, Cölbe, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Diagonal, Münster, Deutschland
TRIS	Diagonal, Münster, Deutschland

Tryptanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser für Molekularbiologie	Diagonal, Münster, Deutschland

### 2.1.3. Software

SoftWare	Hersteller
FACS Diva 6.1.3	BD Bioscience, San Jose, USA
FlowJo 8.8.7 für Mac	Tree Star, Ashland, USA
Prism 5c	Graph Pad, La Jolla, USA

### 2.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alx647 CD45.1, Clone A-20, Mouse IgG2a, κ	Biolegend, San Diego, USA
Alx647 CD90.1, Clone OX-7, Mouse IgG1, κ	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Biotin Micro Beads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti-CD40 purified	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
APC IFN-γ, Clone XMG 1.2, Rat IgG1, κ	Biolegend, San Diego, USA
APC Rat IgG1, κ, Isotype Control	Biolegend, San Diego, USA
Biotin CD11b, Clone M1/70, Rat IgG2a, κ	Biolegend, San Diego, USA
Biotin CD11c, Clone N418, Armenian Hamster IgG	Biolegend, San Diego, USA
Biotin CD45R/B220, Clone RA3-6B2, Rat IgG2a, κ	Biolegend, San Diego, USA
Biotin CD49b, Clone DX5, Rat IgM, κ	Biolegend, San Diego, USA
Biotin CD8α, Clone 53-6.7, Rat IgG2a, κ	Biolegend, San Diego, USA
Biotin Ly-6G (Gr-1), Clone RB6-8C5, Rat IgG2b, κ	Biolegend, San Diego, USA
Biotin TER-119, Clone TER-119, Rat IgG2b, κ	Biolegend, San Diego, USA
BrdU FITC Set, Clone: 3D4	BD, San Jose, USA
FITC CD45.1, Clone A20, Mouse IgG2a, κ	Biolegend, San Diego, USA
FITC Ly-6C, Clone AL-21, IgM, κ	BD, San Jose, USA
FITC Ly-6C, Clone HK1.4, Rat IgG2c, κ	Biolegend, San Diego, USA
FITC CD44, Clone IM7, Rat IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, USA
FITC TCR β chain, Clone H57-597, Armenian Hamster IgG	Biolegend, San Diego, USA
FITC TNF-α, Clone MP6-XT22, Rat IgG, κ	Biolegend, San Diego, USA

FITC anti-mouse V $\beta$ 3, Clone K725, Armenian Haster IgG	a gift from N. Asinovski, C. Benoist, and D. Mathis, Harvard Medical School, Boston, MA
FITC CD90.1, Clone HIS51, IgG2a, $\kappa$	eBioscience, San Diego, USA
FITC Rat IgG1, $\kappa$ Isotype control	Biolegend, San Diego, USA
PE CD4, Clone GK1.5, Rat IgG2b, $\kappa$	Biolegend, San Diego, USA
PE CD62L, IgG2a, $\kappa$	eBioscience, San Diego, USA
PE IL-2, Clone JES6-5H4, Rat IgG2b, $\kappa$	Biolegend, San Diego, USA
PE p-c-Jun, Mouse IgG1	Santa Cruz, Dallas, USA
PE Rat IgG1, $\kappa$ , Isotype control	Biolegend, San Diego, USA
PE/Cy5.5 CD4, Clone RM4-5, Rat IgG2b, $\kappa$	Biolegend, San Diego, USA
Streptavidin-PE	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

### 2.1.5. Versuchstiere

Diese Doktorarbeit basiert auf experimentellen Daten aus Versuchen, die an Mäusen der Linien ANDxCD45.1, ANDxCD90.1, li-rTAxTIM, und B10.BR durchgeführt wurden. Die Tiere wurden im Institut für Immunologie gezüchtet und im Alter von 6-12 Wochen für Experimente verwendet. Die Mäuse wurden in Pathogen-armer Umgebung, in individuell ventilierten Käfigen mit Filterdeckel gehalten. Pro Stunde erfolgten mindestens 10 Luftwechsel. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter. Käfige, Futter, Wasser, Einstreu und Nestwatte wurden durch Autoklavieren sterilisiert und ausschließlich unter Umsetzstationen geöffnet. Die Raumtemperatur wurde konstant zwischen 22-24°C gehalten. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Tötung erfolgte durch eine 3-minütige CO<sub>2</sub> Begasung.

#### 2.1.5.1. AND TCR-transgene Mäuse

In den in dieser Doktorarbeit beschriebenen Experimenten wurden AND TCR-transgene Tiere als Spender für CD4<sup>+</sup> Lymphozyten für den adoptiven Zelltransfer verwendet. Diese Tiere zeichnen sich dadurch aus, dass ihre primären und sekundären lymphatischen Organe hohe Prozentsätze von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen enthalten (Kaye et al., 1989). Nahezu alle T-Zellen dieser Tiere exprimieren die TCR $\alpha\beta$ -Transgene. Das bedeutet, dass sich der TCR fast aller T-Zellen dieser Mäuse aus den transgenen V $\alpha$ 11- und V $\beta$ 3-Ketten zusammensetzt und für das Mottencytochrom c

(MCC) im Kontext des MHC-Moleküls H-2E<sup>k</sup> spezifisch ist. Dieser TCR steuert die T-Zell-Entwicklung im Thymus sehr effizient in das CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellkompartiment, weshalb die T-Zellen der Lymphknoten fast ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind (Kaye et al., 1989). Die von uns verwendeten Tiere wurden ursprünglich von Jackson Laboratories bezogen und im Institut für Immunologie der LMU München gehalten und gezüchtet. Um die transferierte Population auch als solche erkennen zu können, mussten die Spendertiere gleichzeitig einen der kongenen Marker CD45.1 oder CD90.1 tragen. Die kongene Marker CD45.1 und CD90.1 wurden von B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ und B6.PL-Thy1<sup>a</sup>/CyJ Mäusen (Jackson Laboratories) eingekreuzt. Die Empfängertiere des adaptiven Zelltransfers in den durchgeführten Versuchen trugen den kongenen Marker CD45.2 bzw. CD90.2.

#### **2.1.5.2 Ii-rTAxTIM Mäuse**

Um den Einfluss der Antigenpersistenz und der Antigendosis auf den Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, führten wir Versuche an doppelt-transgenen Tieren der Linie Ii-rTAxTIM durch. Diese dienten als Empfängertiere bei dem adoptiven Transfer von T-Lymphozyten. Die transgenen Mauslinien wurde von Reinhard Obst und Hisse van Santen am Institut für Immunologie und Immunogenetik des Joslin Diabetes Center der Harvard University hergestellt (Obst et al., 2005; van Santen et al., 2004). Die Mäuse der Linie Ii-rTAxTIM entstehen durch Kreuzung von Tieren der Linie TIM (Tetracyclin-induzierbare invariante Kette mit MCC) mit solchen der Linie Ii-rTA (invariant chain reverse transactivator). Die Mäuse der Linie TIM exprimieren ein Peptid des Cytochroms der Motte (MCC<sub>93-103</sub>) als Teil der MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii). Die Expression des Epitops wird durch einen Tetracyclin-abhängigen Promoter reguliert. Das Peptid MCC<sub>93-103</sub> wird durch das MHC-II-Molekül H-2E<sup>k</sup> präsentiert. Das rTA Gen der Ii-rTA Mauslinie kodiert für einen reversen Transaktivator, seine Transkription wird von einem Eα-Enhancer und Ii-Promotor reguliert. Die beiden genannten Elemente bewirken die Expression des Reportergens in MHC-II-tragenden Zellen. In doppelt-transgenen Tieren der Linie Ii-rTA-TIM konnte TIM mRNA nach oraler Gabe von Doxycyclin festgestellt werden, während keine Nachweis der TIM mRNA in Abwesenheit von Doxycyclin möglich ist. Es zeigte sich, dass das Epitop MCC<sub>93-103</sub>/ E<sup>k</sup> nicht auf B-Zellen, aber auf dendritischen Zellen stark präsentiert wird (Obst et al., 2005).

### **2.1.5.3 B10.BR Mäuse**

Bei B10.BR handelt es sich um eine kongene Mauslinie mit dem genetischen Hintergrund des C57BL/10SnSg-Stammes, in der MHC-Lokus H-2<sup>k</sup> aus C57BR/cdJ eingekreuzt wurde (Stimpfling and Richardson, 1965). B10.BR-Tiere (stock No. 004804) wurden 2006 von den Jackson Laboratories angeschafft und seither im Institut für Immunologie der LMU gehalten und gezüchtet. In den in dieser Doktorarbeit beschriebenen Experimenten wurden B10BR-Tiere als transgennegative Kontrolltiere verwendet.



## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR-Analyse**

#### **2.2.1.1. Mausmarkierung und DNA Gewinnung**

Um transgene Mäuse für die Versuche eindeutig identifizieren und für die entsprechenden Versuche richtig auswählen zu können, wurde zuvor die Maustypisierung mittels PCR-Analyse durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die zu typisierenden Mäuse eindeutig durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Als nächstes wurde den Versuchstieren ein etwa 2 mm langes Stück der Schwanzspitze entnommen und in ein entsprechend gekennzeichnetes Eppendorfgefäß mit 200 µl Proteinase K-haltigen Puffer (PK-Puffer) gelegt. Da die Serinprotease Proteinase K bei 55-60°C optimal arbeitet, wurde das Material für >6 Stunden im Zellkulturschrank bei 56°C inkubiert und gelegentlich gemischt bis es vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde die Proteinase K durch eine 10-minütige Inkubation 95°C im Hitzeblock der PCR-Maschine inaktiviert.

#### **2.2.1.2. DNA-Auftrennung mit Phenolchlorophorm**

Durch das Hinzufügen von 250 µl einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (pH>6.6) und anschließendes 5-minütige Zentrifugieren bei 14.000 rpm wurde der DNA-haltige Überstand getrennt und in ein mit 1000 µl reinem Ethanol gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Invertieren des Gefäßes wurde das Ausfällen der DNA beobachtet. Nach einem erneuten 2-minütigen Zentrifugationsvorgang bei 2000 rpm, die DANN präzipitierte am Boden des Gefäßes, der Ethanol wurde entfernt und die DNA in 100µl TE in entsprechend gekennzeichnete 8er-PCR-Streifen überführt.

Aus Sicherheitsgründen erfolgten alle Arbeitsschritte auf der Sicherheitswerkbank unter Luftabzug. Bei allen Pipettievorgängen wurden ausschließlich Filtertips verwendet, um eine Kontamination der Proben zu vermeiden.

***Herstellung der notwendigen Lösungen:***

***10x Verdun-Puffer***

		Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	für 100 ml
<b>TRIS, pH 8,8</b>		1 M	670 mM	67 ml
<b>Ammoniumsulfat</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M	166 mM	16,6 ml
<b>Magnesiumchlorid</b>	MgCl <sub>2</sub>	1 M	65 mM	6,5 ml
<b>Gelatin</b>		2%	0,10%	5 ml
<b>Wasser</b>	H <sub>2</sub> O			4,9 ml

***PK-Puffer***

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	für 100 µl
<b>Wasser</b>			81 µl
<b>Verdan-Puffer</b>	10x	1x	10 µl
<b>Proteinase K</b>	20 mg/ml	0,3 mg/ml	3 µl
<b>Triton X-100</b>	10%	0,50%	5 µl

***TE***

	Konz. Stammlösung	Endkonzentration	für 50 ml
<b>TRIS, pH 7,6</b>	1 M	10 mM	0,5 ml
<b>EDTA</b>	500 mM	1 mM	0,1 ml

***TAE 50x 1 Liter Lösung***

<b>TRIS Base</b>	242 g
<b>Essigsäure 99%</b>	57,1 ml
<b>EDTA, pH8</b>	100 ml

***Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50 ml Lösung***

<b>Chloroform</b>	24 ml
<b>Isoamylalkohol</b>	1 ml
<b>Phenol, pH 7.5-8.0</b>	25 ml

### *Ladepuffer*

<b>Orange G</b>	250 mg
<b>Glycerin 30%</b>	30 ml
<b>Wasser</b>	70 ml

### **2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion**

#### *Mastermix*

	Konzentration Stammlösung	
Wasser		15,875 µl / Reaktion
PCR Puffer		2,5 µl / Reaktion
Betain	5 M	2,5 µl / Reaktion
Oligo 1	10 mM	1,25 µl / Reaktion
Oligo 2	10 mM	1,25 µl / Reaktion
dNTPs	10 mM	0,5 µl / Reaktion
Taq-DNA-Polymerase	5 U/ml	0,125 µl / Reaktion

Im ersten Schritt wurde der Mastermix ohne Taq-DNA-Polymerase in einem gekühlten Eppendorfgefäß zusammengegeben und auf Eis gehalten. 1 µl DNA-Probe wurden mithilfe einer Multikanalpipette jedem well einer PCR-Platte zugegeben. Die Taq (5 U/ml) wurde zu Mastermix hinzugefügt und gemischt. 24 µl Mastermix wurden pro DNA-Probe hinzugefügt. Um das Verdunsten des Mastermixes während der PCR-Reaktion zu vermeiden, wurde jedem well der PCR-Platte jeweils 1 Tropfen Öl hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen in den zuvor vorgewärmten Hitzeblock der PCR-Maschine eingesetzt und der Amplifikationszyklus gestartet.

Amplifikationszyklus: (5' 95°, [30" 95°, 30" 55°, 45" 72°] x 35, 5' 72°)

10 µl der PCR-Produkte wurden mit 10 µl Ladepuffer gemischt und mithilfe eines 1,5% Agarosegels (1,5 g Agarosepulver in 100 ml TAE-Puffer angerührt, kurz aufgekocht und schließlich 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigemischt) aufgetrennt. Das Ergebnis wurde mithilfe einer UV-Lampe abgelesen.

Im Folgenden sind die Sequenzen für die verwendeten Primer angegeben. Die Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg) wurden in 1 mM Tris-HCl pH 7,2 zur Konzentration von 10 µM gelöst.

#### **TIM**

RO 235: 5`- CTCATCTCAAACAAGAGCCA

RO 236: 5`- CACTGCTTACTTCCTGTACC

#### **Ii-RTA**

RO 237: 5`- AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG

RO 238: 5`- CATGATATAGACGTTGTGGCTGTT

### **2.2.2. Maustypisierung mittels FACS-Analyse**

#### ***FACS-Medium:***

<b>DMEM (ohne Phenolrot)</b>	500 ml
<b>BSA</b>	1%
<b>HEPES, IM</b>	5 ml

#### ***RBL:***

Biologend RBC Lysis Buffer, 1:10 in Wasser verdünnt

Um zwischen den Mäusen mit den kongenen Markern CD45.1 und CD45.2 bzw. CD90.1 und CD90.2 unterscheiden zu können, wurden die Tiere mittels FACS-Analyse typisiert. Zuvor wurden die Tiere durch Ohrmarkierungen eindeutig markiert. Den zu typisierenden Mäusen wurden wenige Tropfen Blut entnommen und in einem entsprechend markierten Eppendorfgefäß in PBS/5 mM EDTA gesammelt und 1 Minute lang bei 3000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 1x RBL resuspendiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Suspension 1 Minute bei 3000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl FACS-Medium aufgenommen, in eine Rundboden-96-Well-Platte übertragen und anschließend wie unten beschrieben für Oberflächenmarker gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.2.3. Organentnahme und Präparation

#### *Medium*

<b>DMEM, ohne Phenolrot</b>	500 ml
<b>HEPES, IM</b>	5 ml

#### 2.2.3.1. Lymphknotenpräparation

Subcutane Lymphknoten (axilläre, brachiale, inguinale, oberflächliche cervicale) (Van den Broeck et al., 2006) wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und in einer Petrischale mit 5 ml Medium mithilfe der rauen Seiten zweier Glasobjektträger zu einer homogenen Suspension zerrieben. Diese wurde mithilfe einer Pasteurpipette mit 5 ml Medium durch einen 150 µm Filter in ein 14 ml Falcon-Tube filtriert. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen, anschließend wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und die Lymphozyten in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### 2.2.3.2. Milzpräparation

Die Milz wurde unter aseptischen Bedingungen entnommen und in einer Petrischale mit 10 ml Medium mithilfe der rauen Seiten zweier Glasobjektträger zu einer homogenen Suspension zerrieben und durch einen 150 µm Filter in ein 5 ml Falcon Tube filtriert. Die Suspension wurde mit 5 ml Ficoll unterschichtet und anschließend 15 Minuten bei 2000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Erythrozyten bilden dabei ein Pellet am Boden des Röhrchens, Lymphozyten bildeten eine Zwischenphase zwischen Ficoll und Medium. Die Lymphozyten wurden in ein Falcon-Tube überführt und 2 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen und die Lymphozyten in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 2.2.4. Anreicherung der CD4<sup>+</sup> Zellen durch MACS Isolation

Wir wandten die immunmagnetische Isolation zur Gewinnung reiner CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lymphknotenzellen der Spendertiere für den adoptiven Zelltransfer. Dabei nutzten wir vor allem das Prinzip der negativen Selektion. Hierbei wurden alle Lymphknotenzellen außer CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> T-Zellen, d.h. Erythrozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten und zytotoxische T-Lymphozyten, mit an magnetische Beads gekoppelten Antikörpern markiert. Die Zellsuspension aus Lymphknotenzellen wurde durch eine

magnetische Kolumne gespült, das Eluat enthielt > 90% CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> T-Zellen. Um die Zellen so aufzureinigen, wurden die Lymphknotenzellen in 200 µl Medium suspendiert und auf Eis gehalten.

Pro Spendertier wurde in 150 µl Medium wurde eine Antikörpermischung angesetzt aus:

<b>Biotin-Antikörper</b>	<b>Zielzellen</b>	<b>Menge</b>
CD8	T-Lymphozyten	10 µl
CD45R	B-Lymphozyten	10 µl
CD49	NK-Zellen	5 µl
GR-1	Granulozyten	5 µl
CD11b	Makrophagen	5 µl
CD11c	DCs	5 µl
TER119	Erythrozyten	5 µl

Die Zellsuspension und die Antikörpermischung wurden in einem Eppendorfgefäß gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschvorgänge mit jeweils 1 ml Medium. Dazu wurden die Zellen 2 Minuten bei 850g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen erneut 200 µl Medium resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden für spätere Analysen in eine 96 Well-Platte auf Eis aufgehoben. In das Eppendorfgefäß mit der Zellsuspension wurden 15 µl Anti-Biotin-Microbeads hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten 2 Waschvorgänge mit Medium und Resuspension der Zellen in 1 ml Medium. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine zuvor mit 3 ml Medium equilibrierte LS-MACS-Kolumne gegeben, das Eluat wurde in einem Falcon-Tube aufgefangen, die Kolumne zweimal mit 3 ml Medium gespült. Die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls gesammelt. Das Eluat wurde 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100µl FACS-Medium in ein Eppendorfgefäß überführt. Eine kleine Menge der Suspension, sowie eine Probe aus nicht separierten Zellen wurden mit anti-Streptavidin und anti-CD4 Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert, um den Reinheitsgrad der CD4<sup>+</sup> Zellen nach MACS-Isolierung zu überprüfen. Ziel war eine Reinheit der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> T-Zellen von > 90%.

### **2.2.5. Adoptiver Zelltransfer**

Jeweils 2x10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>/CD90.1<sup>+</sup> Lymphozyten wurden in 100 µl DNEM/5 mM HEPES Medium aufgenommen und unter aseptischen Bedingungen pro Empfängertier in die Schwanzvene injiziert.

### **2.2.6. Intravenöse Injektion in die Schwanzvene**

Die intravenöse Injektion erfolgte in die Schwanzvene der Tiere. Um die Venen besser hervortreten zu lassen, wurde der Käfig mit den Tieren etwa 5 Minuten unter einer Infrarotlampe aufgewärmt. Die Mäuse wurden anschließend einzeln in eine Halterung transferiert, der Schwanz wurde unter Spannung gehalten und mit einer 1 ml, zuvor entlüfteten, Spritze wurde dann das venöse Gefäß punktiert. Die Kanüle wurde möglichst weit eingeführt und die korrekte Platzierung durch Blutaspiration kontrolliert. Die Injektion durfte aufgrund des Gefäßkalibers nicht zu schnell erfolgen.

### **2.2.7. Anti-CD40-Behandlung**

Alle Empfängertiere der Linie Ii-rTAXTIM wurden einen Tag vor dem adoptiven Zelltransfer mit 20 µg eines monoklonalen Antikörpers gegen das CD40 behandelt. Dieser wurde in sterilem PBS gelöst und intraperitoneal (i.p.) appliziert. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass seine Kostimulation der DCs mit anti-CD40 zur Stabilisierung des MHC-II-Antigen-Komplexes auf den DCs beiträgt (van Santen et al., 2004).

### **2.2.8. Doxycyclin-Behandlung**

Um die Situation einer konstanten Antigenpräsentation zu modellieren wurden die Tiere der Mauslinie Ii-rTAXTIM, welche das Antigen auf den DCs in Abhängigkeit von Doxycyclin präsentieren, mit Doxycyclin-haltigem Trinkwasser behandelt. Dazu wurde Doxycyclin in an divalenten Kationen-armen Wasser gelöst, in lichtgeschützte Trinkflaschen gefüllt und den Tieren ad libitum verabreicht. Die Lösung wurde täglich neu angesetzt, um das Ausfällen des Doxycyclins zu vermeiden und somit eine konstante Doxycyclin-Konzentration im Trinkwasser zu erreichen. Die Doxycyclin-Konzentrationen variierten in Abhängigkeit von der Fragestellung zwischen 2 bis 100 µg/ml.

### **2.2.9. Färbemethoden und durchflusszytometrische Zellanalyse**

#### **2.2.9.1. Färbung der Oberflächenmoleküle**

Zur Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften der Lymphozyten und ihres Aktivierungszustandes wurde eine 4-Farben Durchflusszytometrie durchgeführt. Die

Durchflusszytometrie ermöglicht nach entsprechender Färbung der Oberflächenmoleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern qualitative und quantitative Aussagen über die untersuchten Zellen.

Nach Isolation der Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten (siehe Kapitel Milzpräparation) wurden die Zellen in 1 ml FACS-Medium aufgenommen.  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in ein well einer 96-well-Platte transferiert. 100  $\mu$ l einer Antikörpermischung wurden pro well hinzugegeben. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden zuvor je nach Antikörper 1:100-1:400 in FACS-Medium verdünnt und 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert, um komplexierte Antikörper zu präzipitieren. Die Proben wurden 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, anschließend wurden 100  $\mu$ l FACS-Medium hinzugefügt und die Platte bei 1 Minute bei 2000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin folgte ein erneuter Waschvorgang mit FACS-Medium, anschließend wurden die Zellen in 200  $\mu$ l FACS-Medium aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.2.9.2. Intrazelluläre Zytokinfärbung

#### *Zellkulturmedium*

<b>IMDM</b>	500 ml
<b>Hitzeinaktiviertes FCS</b>	50 ml
<b>200 mM L-Glutamin</b>	5 ml
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	5 ml
<b>2-Mercaptoethanol</b>	2 $\mu$ l

Um eine Aussage über den Funktionszustand der Zellen nach chronischer Antigenexposition treffen zu können, führten wir eine Bestimmung ihrer Zytokinproduktion durch. Da es sich in den hier beschriebenen Experimenten untersuchten Zellen vorwiegend um Th1 Zellen handelte, wurden IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  intrazellulär gefärbt. Dazu wurden die T-Zellen aus den Milzen der Empfänger, wie oben beschrieben, durch den Ficoll-Gradienten gereinigt.  $5-10 \times 10^6$  Lymphozyten wurden in 1 ml Zellkulturmedium pro well einer 24-well-Platte im Zellkulturschrank bei 37°C mit 20 ng/ml PMA und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin für 2 Stunden inkubiert, 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A wurden hinzugefügt und die Zellen für weitere 2 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Brefeldin A bewirkt eine Redistribution der intrazellulär produzierten Proteine, in unserem Fall der Zytokine, vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Reticulum, was die Sekretion verhindert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, wie in 2.2.6.1 beschrieben, für Oberflächenmarker CD4 und CD45.1,



bzw. CD90.1 gefärbt. Anschließend wurde die Zellen in FACS-Medium gewaschen, bei 350 g zentrifugiert, in 500 µl Fixierung-Puffer der Firma Biolegend in einem Eppendorfgefäß resuspendiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 Minuten bei Raumtemperatur bei 350 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in Permeabilisations-/Wasch-Puffer der Firma Biolegend (1:9 in Wasser verdünnt) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Anti-Zytokin- und Isotyp-Kontroll-Antikörpern gefärbt. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Der Färbevorgang erfolgte 20 Minuten lang bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Daraufhin folgten 2 Waschvorgänge im Permeabilisations-/Wasch-Puffer, anschließend wurden die Zellen im FACS-Medium resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

### **2.2.9.3. Intrazelluläre Färbung des phosphorylierten Transkriptionsfaktor Jun**

Das Peptid MCC<sub>88-103</sub> wurde den Versuchstieren intravenös injiziert. Damit wurde den Zellen ein starkes Aktivierungssignal verabreicht. Nach 60 Minuten erfolgte die Milzextraktion. Die Milz wurde 4 ml FACS-Medium aufgenommen, mithilfe der rauen Seiten der Objektträger zerrieben und durch einen 150 µm Filter in ein 14 ml Falcon Tube filtriert. Um den intrazellulär liegenden Transkriptionsfaktor Jun färben zu können, mussten die Zellen fixiert und dann permeabilisiert werden. Dazu wurden 2 ml der Einzelzellsuspension mit 2 ml im Wasserbad auf 37°C erwärmtem BD FixBuffer vermischt und 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml FACS-Medium gewaschen und erneut 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet während leichtem Vortexen in 0,5 ml auf -20°C gekühltes BD Phosflow PermBuffer III aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein Waschvorgang mit FACS-Medium. Die Zellen wurden im FACS-Medium resuspendiert und in einer 96-Well-Platte verteilt.  $2 \times 10^6$  Zellen wurden mit 10 µl PE-anti-P-c-jun (1:1 verdünnt) 15 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Darauf folgte die Oberflächenfärbung, wie oben beschrieben, und die durchflusszytometrische Analyse der Proben.

## **2.2.10. Proliferationsassays**

### **2.2.10.1. In-vivo-Proliferationsassay mit CFSE**

Um Proliferationsfähigkeit adoptiv transferierter Zellen in vivo quantitativ messen zu können, wurden die Donorzellen zuvor mit CFSE markiert. Dazu wurden  $2 \times 10^7$ /ml T-Zellen in 1 ml vorgewärmtem PBS 0.1 % BSA-Lösung in einem 14 ml Falcon Tube resuspendiert und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 2 µl einer 5 mM 5(6)-CFDA-Lösung, während Schütteln der Suspension mithilfe eines Vortex zugefügt. Die Lösung wurde im Wasserbad 10 Minuten lang inkubiert, nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Lösung nochmals am Vortex durchmischt. Dann wurde die Suspension mit der gleichen Menge FCS unterschichtet. Darauf folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsvorgang bei 1500 rpm. Zum Schluss wurden die gefärbten Zellen in einer DMEM/Hepes-Lösung gewaschen und resuspendiert, so dass 100 µl Lösung  $2 \times 10^6$  Zellen enthielten. Jeweils 100 µl wurden in die Schwanzvene des Empfängers injiziert.

### **2.2.10.2. BrdU-In-vivo-Proliferationsassay (Tough and Sprent, 1994)**

**BrdU:** 1 mg/ml in PBS für intraperitoneale Injektionen bei -80°C gelagert

0.8 mg/ml BrdU in Volvic-H<sub>2</sub>O, frisch angesetzt

**Paraformaldehyd-Fixativ:** 1% Paraformaldehyd 4%-Lösung bei -20°C gelagert und 0,01% Tween-20 in PBS frisch angesetzt. Vor Gebrauch mit 0,2 µl-Filter filtriert.

**DNAse I-Lösung:** 50 U/ml DNAse I (Stammlösung: 20 mg/ml = 40 U/µl) in 4,2 mM MgCl<sub>2</sub>

Um das Proliferationsverhalten von Zellen in vivo unabhängig von adoptivem Transfer beurteilen zu können, führten wir den in vivo Proliferationsassay mithilfe von Brom-deoxy-Uridin (BrdU) durch. BrdU ist ein Nukleotidanalogen, welches in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und in einem zweiten Schritt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden kann. Dabei markiert BrdU in der DANN Zellen, die seit dem Beginn der BrdU-Verabreichung proliferiert haben. Um eine kontinuierliche Aufnahme des BrdU in die Zellen gewährleisten zu können, wurden 100 µg BrdU in 100 µl PBS, den Versuchstieren 72 Stunden vor Auswertung der Experimente einmalig intraperitoneal injiziert, zudem wurde eine BrdU-haltige Trinkwasserlösung in der Konzentration 0,8 mg/ml konstant über 72 Stunden oral verabreicht. Die Trinklösung wurde täglich frisch zubereitet. Am Tag der Auswertung wurden die Milzen der Versuchstiere

entnommen und die T-Lymphozyten isoliert und in DMEM/Hepes-Medium aufgenommen. Etwa  $10 \times 10^6$  Zellen wurden in einer 96-well-Platte verteilt, sodass  $5 \times 10^6$  Zellen sich in einem well befanden. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben für die Oberflächenmarker CD4, CD45.1 bzw. CD90.1 gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen mit 1 ml PBS transferiert und 5 Minuten bei 1700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500  $\mu$ l eiskaltem 0,15 M NaCl resuspendiert. Während leichtem Vortexen wurden tropfenweise 1,2 ml eiskalten 95% Ethanol zugeben und die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Waschvorgang mit 2 ml PBS zugegeben und eine 5-minütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 1700 rpm. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Pellet in 1 ml Paraformaldehyd-Fixativ resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine ausreichende Permeabilisation der Zellmembran wird durch das Hinzufügen von Tween 20 zur Paraformaldehyd-Lösung gewährleistet (Carayon et. Bord 1992). Auf die Zellfixierung und Permeabilisierung folgte ein erneuter 5-minütiger Zentrifugationsvorgang bei 1700 rpm, um das Paraformaldehyd von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml DNase I (50 U/ml) zur DNA-Denaturierung resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Verdau mittels DNase I erlaubte die Färbung des inkorporierten BrdU im nächsten Schritt. Nach Zugabe von 2 ml PBS wurde die Suspension 5 Minuten bei 1700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 15  $\mu$ l FITC-Anti-BrdU-Antikörper gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PBS zugegeben und die Suspension bei 1700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Analyse gelagert.

### **2.2.11. Statistische Auswertung**

Die experimentellen Gruppen bestanden aus 1-2 Mäusen, wobei die Experimente mindestens dreimal durchgeführt wurden. In den graphischen Darstellungen entspricht jeder Punkt einer Maus. Die Ergebnisse wurden mittels *unpaired two-tailed t-test* mithilfe der Prism Software, Version 5c (Graph Pad) verglichen.

### 3. Fragestellung

Es ist bekannt, dass einige chronische Infektionen wie unbehandelte HIV- oder HBV/HCV-Infektionen mit einer hohen Antigenlast einhergehen und mit Erschöpfung spezifischer T-Helferzellen verbunden sind. In anderen Infektionen wie EBV oder CMV hingegen persistieren Viren latent, wodurch das Antigen in geringen Mengen präsentiert wird und es zu keiner Erschöpfung der T-Zellen kommt. Mit den für den experimentellen Teil dieser Doktorarbeit zur Verfügung stehenden doppelt-transgenen Tieren und vor dem Hintergrund der Literatur zur Erschöpfung spezifischer CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in chronischen Infektionen konnten folgende Fragen untersucht werden:

- a. Inwieweit kann die Antigenexposition allein, in der Abwesenheit pathogener Erreger, systemischer Entzündungsreaktionen oder der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, für das Auftreten eines erschöpften Phänotyps der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich gezeigt werden?
- b. Unterscheiden sich die spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach hoher oder geringer chronischer Antigenexposition voneinander bzw. im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die keine Antigenexposition hatten? Sind sie in Hinsicht auf ihre Proliferation, Expression von Aktivierungs- oder Inhibitionsmarker und Zytokinproduktion differenzierbar?
- c. Kommt es zu einer Veränderung der absoluten Zahlen spezifischer T-Helfer-Zellen nach einer chronisch niedrigen und hohen Antigenexposition infolge klonaler Deletion?
- d. Welche Rolle spielt die Dauer der Erschöpfungsphase für die phänotypischen Veränderungen spezifischer T-Helfer Zellen?
- e. Was sind mögliche Ursachen für die phänotypischen Veränderungen antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Erschöpfungsphase?

Um die gestellten Fragen beantworten zu können, führten wir eine Reihe von Versuchen in doppelt-transgenen Mäusen durch. In diesen wird unter Behandlung mit Doxycyclin ein Antigen auf DCs präsentiert, welches spezifisch von adoptiv transferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen erkannt wird. Durch gezieltes Zuführen und Absetzen von Doxycyclin im Trinkwasser kann die Präsentation eines Modellantigens auf dendritischen Zellen in vivo gesteuert werden.

Unter den genannten Bedingungen werden weder Zellen des angeborenen noch des adaptiven Immunsystems wie B-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert. Durch Stimulation ausschließlich der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann ihr Phänotyp und Verhalten Pathogen-unabhängig und unter Ausschaltung komplizierender Faktoren, zum Beispiel der systemischen Inflammation, untersucht werden.

Die Versuchsreihen dieser Doktorarbeit waren folgendermaßen strukturiert:

In den ersten Versuchen wurde eine niedrige Antigendosis definiert, also die Doxycyclin-Dosis, die zu reproduzierbar niedriger Antigenpräsentation führte. Anschließend wurde der allgemeine Versuchsaufbau etabliert, in dem die Priming- oder Aktivierungsphase und die Erschöpfungsphase definiert wurden.

In den darauffolgenden Experimenten wurde zunächst das Proliferationsverhalten, dann die Expression von Aktivierungsmarkern und die Zytokinproduktion der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase ermittelt. Zudem wurde anhand absoluter Zellzahlen die Überlebensfähigkeit der spezifischen Zellen abgeschätzt.

In der nächsten Versuchsreihe wurden die oben genannten Parameter der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase ermittelt.

Abschließend versuchten wir die möglichen verantwortlichen molekularen Mechanismen der T-Helfer-Zell-Erschöpfung zu identifizieren. Dabei testeten wir die oberflächliche TCR-Expression und intrazellulär die Fähigkeit der Zellen, den Transkriptionsfaktor c-JUN nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase phosphorylieren zu können.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung der Versuchstiere

#### 4.1.1. Spendertiere: Quelle der untersuchten T-Zellen

Die in dieser Doktorarbeit untersuchten  $CD4^+$  T-Zellen wurden aus den Lymphknoten AND-TCR-transgener Mäuse gewonnen und intravenös in Empfängertiere transferiert. Dazu wurden die Lymphknoten der AND-TCR-transgenen Mäuse, wie im Kapitel 2 (Materialien und Methoden) beschrieben, präpariert und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Es wurden Lymphknotenzellen verwendet, weil diese einen hohen Prozentsatz (55-65%) spezifischer und homogen naiver Zellen enthalten. Zudem enthalten Lymphknoten im Gegensatz zu muriner Milz keine hämatopoetischen Stammzellen, welche die Interpretation adoptiver Transferexperimente durch Reifung neuer Zellen im Thymus des Empfängertieres hätten beeinträchtigen können (Ge et al., 2002).

Vor dem Transfer wurden Oberflächenmoleküle der Lymphknotenzellen der Donor-Tiere gefärbt (dazu siehe Kapitel 2. Materialien und Methoden) und im Durchflusszytometer analysiert. Die zu transferierenden  $CD4^+$  T-Zellen sollten folgende Voraussetzungen erfüllen:

- a. AND-TCR-transgen sein und diesen TCR homogen exprimieren,
- b. zum Wiederauffinden der Zellen nach dem Transfer einen kongenen Marker (CD45.1 oder CD90.1) exprimieren und
- c. zuvor keinen Antigenkontakt oder anderweitige Aktivierung im Spendertier erfahren haben und somit einen „naiven“ Phänotyp ( $CD44^{int}/CD62^{high}$ ) zeigen.

Die **Abb. 1** zeigt durchflusszytometrische Analysen der Lymphknotenzellen aus AND CD45.1 Tieren, die routinemäßig als Spendertiere dienten.

In der **Abb. 1a** ist die Färbung der Oberflächenmarker CD4 und CD45.1 auf Lymphknotenzellen dargestellt. In allen durchgeführten Experimenten betrug der Anteil der  $CD4^+/CD45.1^+$  Zellen unter den Lymphozyten zwischen 60 und 80% (rechter oberer Quadrant, (rechts oben, RO)). Die Zellen, die sich im rechten unteren Quadranten (rechts unten, RU) befinden, sind den kongenen Marker CD45.1 tragenden  $CD4^-$  Lymphozyten, d.h. vor allem B-, NK-Zellen und wenige  $CD8^+$  T-Zellen, da AND-TCR-transgene Mäuse einen geringen Anteil an zytotoxischen T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen enthalten (5-10 % der T-Zellen).

Die **Abb. 1b** zeigt die  $V\beta 3/CD4$ -Färbung der Donorzellen. Im RO Quadranten befinden sich T-Helfer-Zellen, die den transgenen Rezeptor tragen (90-95%), jene also, die das Mottencytochrom c

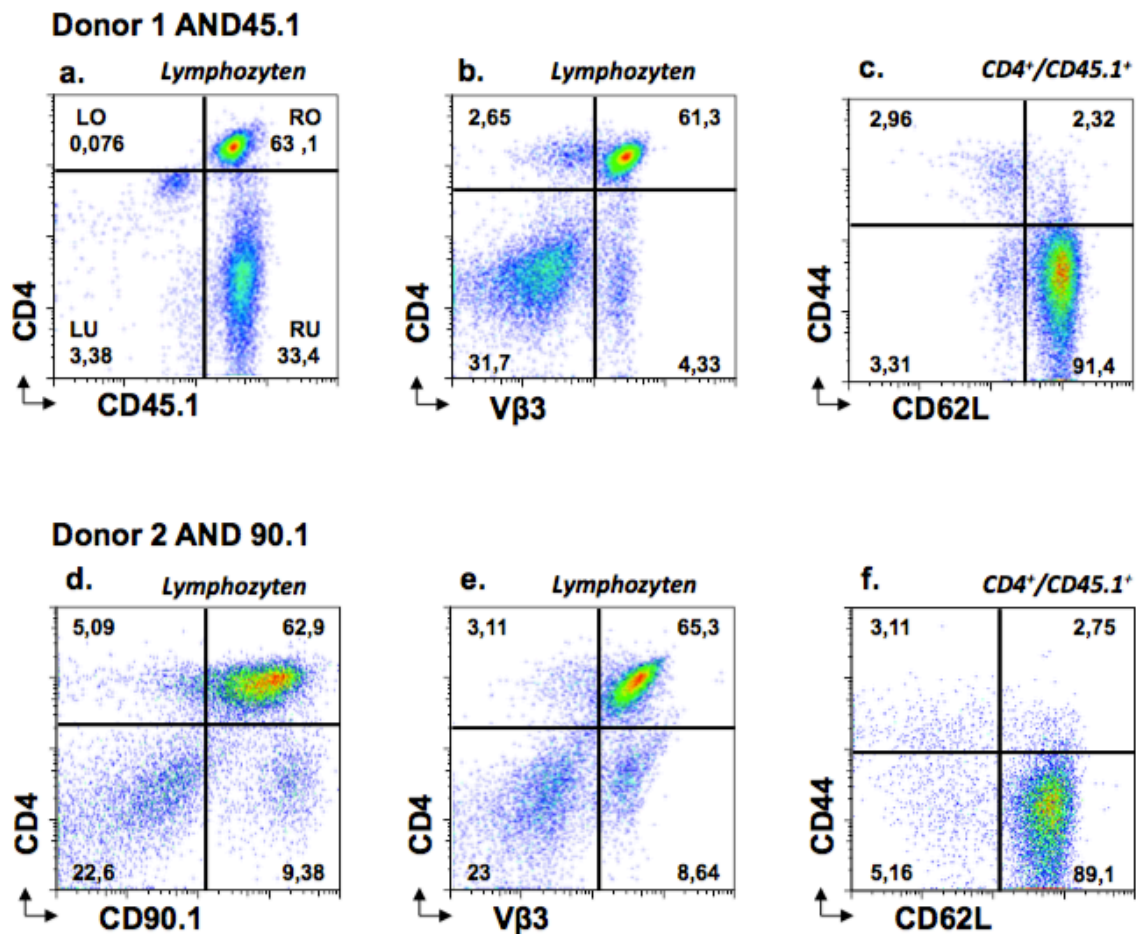
als Antigen spezifisch erkennen. Links oben (LO) sind  $CD4^+$  T-Zellen zu sehen, die endogene rearrangierte TCRs exprimieren (5-10%), RU sind transgene  $CD4^+$  T-Zellen zu finden, links unten (LU) B- und NK-Zellen.

Vor dem Transfer wurde der Aktivierungsstatus der Donorzellen untersucht, um auszuschließen, dass opportunistische Infektionen oder kreuzreaktive Pathogene, die sich in einer konventionellen SPF-Tierhaltung kaum vermeiden lassen, die Zellen beeinflussen. Getestet wurden deshalb die Oberflächenmarker CD44, welches nach Antigenkontakte vermehrt exprimiert wird und CD62L, das naive T-Zellen kennzeichnet (Zimmerman et al., 1996).

In der **Abb. 1c** wird gezeigt, dass  $<5\%$  der transferierten T-Lymphozyten aktiviert sind (LO:  $CD44^{high}/CD62L^{low}$ ). Das bedeutet, dass die Donorzellen vor dem Transfer in die Empfängertiere keinen Antigenkontakt hatten und als naive T-Zellen anzusehen sind. Alternativ zu dem kongenen Marker CD45.1 wurde in einigen Versuchen CD90.1 verwendet. Während CD45 auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, tragen nur T-Zellen CD90. Die Empfängertiere tragen ausschließlich die CD45.2- und CD90.2-Allele, um die Identifikation der transferierten Zellen zu ermöglichen. Die **Abb. 1d-f** zeigen durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten aus den Tieren der AND CD90.1-Linie. In den **Abb. 1d-e** kann man erkennen, dass 65% der Zellen  $CD4^+$  T-Zellen sind und die transgene TCR-V $\beta$ 3 Kette tragen. Die Lymphozyten aus diesem Donor haben vor dem Transfer einen naiven Phänotyp ( $CD44^{low}/CD62L^{high}$ ).

Diese Kontrollfärbungen waren zur Qualitätssicherung und Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Versuche notwendig. Weil das TCR-V $\alpha$ 11-Transgen am gleichen Ort wie die hier getestete V $\beta$ 3-Kette im Mausgenom integriert ist, reicht die Färbung einer transgenen Kette aus, um AND-TCR- transgene Tiere identifizieren zu können.

Nach der durchflusszytometrische Analyse der Donorzellen erfolgte der adoptive Transfer der Lymphozyten in die Empfängertiere (siehe Kapitel 2 (Materialien und Methoden)). Am Tag der Auswertung wurden die Milzen entnommen und aufbereitet (siehe Kapitel 2 (Materialien und Methoden)). Die Lymphozyten wurden für die zu untersuchenden Parameter spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (siehe Kapitel 2 (Materialien und Methoden)).

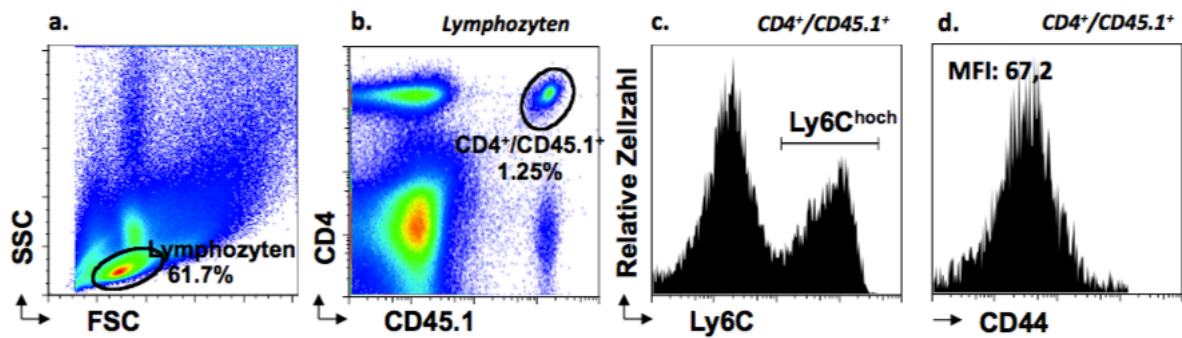


**Abb. 1. Durchflusszytometrische Analyse der Donorzellen aus einer TCR-transgenen AND 45.1 (a - c), und einer AND 90.1 Maus (d - f) unmittelbar vor dem adoptiven Zelltransfer**

- a. Erfassen der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Zellen im Lymphozyten-Gate.  
Rechts oben (RO): T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup>)  
Rechts unten (RU): vor allem B-Zellen, wenige CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup>)
- b. Erfassen der Vβ3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen im Lymphozyten-Gate. Die Vβ3-Kette ist spezifisch für den transgenen T-Zell-Rezeptor.  
Rechts oben (RO): T-Helfer-Zellen mit transgenem TCR  
Links oben (LO): T-Helfer-Zellen mit endogenem TCR  
Rechts unten (RU): CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten  
Links unten (LU): B-Zellen
- c. Ermittlung des Aktivierungszustandes der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup>-Zellen. Darstellung von CD44 und CD62L auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.  
RU: Naive Zellen: CD44<sup>low</sup>/CD62L<sup>high</sup>  
LO: Aktivierte Zellen: CD44<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>
- d. Erfassen der CD4<sup>+</sup>/CD90.1<sup>+</sup> Zellen im Lymphozyten-Gate
- e. Erfassen der Vβ3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen im Lymphozyten-Gate.
- f. Ermittlung des Aktivierungszustandes der CD4<sup>+</sup>/CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen. Darstellung von CD44 und CD62L auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.  
RU: Naive Zellen: CD44<sup>low</sup>/CD62L<sup>high</sup>  
LO: Aktivierte Zellen: CD44<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>



Die Abb. 2 zeigt eine beispielhafte Auswertung der 3-Farben-Zytometrie an einem FACS Calibur® und die Strategie des „Gating“ bei der Analyse der Experimente. Abb. 2a zeigt alle aufgenommenen Zellen und ihre Auftrennung nach Vor- und Seitwärtsstreuung, was Größe und Granularität der Zellen entspricht, in einem Dot-Plot. In der darauffolgenden Datenauswertung können verschiedene Subpopulationen nach ihren Streulicht-Eigenschaften erkannt und entsprechend für weitere Analysen ausgewählt ("gated") werden. In der Abb. 2a wurden Lymphozyten unter allen Zellen ausgewählt und in der Abb. 2b nach der Expression von CD4 und CD45.1 dargestellt. CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> waren die transferierten T-Helferzellen. Wird ein elektronischer Filter ("Gate") auf diese Zellen angewandt, können die für diese Zellen spezifische Marker untersucht werden. Wie man den Abb. 2c und 2d entnehmen kann, kann die Expression von Oberflächenmarkern sehr unterschiedlich ausfallen. Manche zeigen eindeutig voneinander unterscheidbare positive und negative Population, z.B. das Protein Ly-6C in der Abb. 2c. Die Abb. 2d zeigt beispielhaft Expression des Oberflächenmarkers CD44, bei dem die Unterscheidung positiver und negativer Populationen nicht ohne Weiteres möglich ist. In solchen Fällen muss die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt werden, um den Grad der Ausprägung quantitativ ermitteln zu können.



**Abb. 2. Beispielhafte Darstellung und Auswertung der 3-Farben-Zytometrie.**

- Darstellung aller analysierten Milzzellen nach Größe (FSC=Vorwärtstreulicht) und Granularität (SSC=Seitwärtstreulicht) im Dot-Plot. Erfassen der Lymphozyten (klein, wenig Granula). Der prozentuale Anteil der Lymphozyten unter den Milzzellen in den verschiedenen Experimenten lag zwischen 60 und 80%. Im Dot-Plot ist auch eine Monozytenpopulation (groß, wenig Granula) zu erkennen. Die Ansammlung großer Zellen mit hoher Granularität entspricht den Granulozyten.
- Erfassen der adoptiv transferierten T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>-</sup>) im Lymphozyten-Gate (Hier aus einem TCR-transgenen AND 45.1 Donortier). Die Population der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>-</sup> Zellen entspricht den endogenen T-Helfer-Zellen. CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> sind zytotoxische T-Zellen und B-Lymphozyten aus dem Donortier.
- Erfassen der Ly6C<sup>hoch</sup> exprimierenden Zellpopulation unter den CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Lymphozyten im Histogramm. Hier können zwei Subpopulationen unterschieden werden (Ly6C<sup>niedrig</sup> und Ly6C<sup>hoch</sup>).
- Ermitteln der MFI der CD44 exprimierenden Zellen im CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup>-Gate mittels Flow Jo-Software. Da in diesem Fall keine eindeutige Unterscheidung zwischen positiver und negativer Subpopulationen möglich ist, wird die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt, um Daten aus verschiedenen Experimenten vergleichen zu können.

#### 4.1.2. Empfängertiere mit steuerbarer Antigenpräsentation

Um zu untersuchen, wie T-Zellen auf chronische Antigenexposition reagieren, mussten diese über einen definierten Zeitraum in vivo mit Antigen stimuliert werden. Dabei sollten Störfaktoren, wie systemische Inflammation und Interaktion mit anderen Immunkomponenten, die in Infektionsmodellen unvermeidbar sind, umgangen werden. Diese Voraussetzung konnte durch adoptiven Transfer der Donorzellen in doppelt-transgene Empfängertiere der Mauslinie Ii-rTAxTIM erfüllt werden. Das Transgen Ii-rTA (d.b.: Promoter der invarianten Kette (Ii) - reverser Tetracyclin-Transaktivator) kodiert für einen Transaktivator, der nach Bindung von Doxycyclin die Expression des zweiten Transgens TIM (Tetracyclin-induzierbare invariante Kette mit MCC) induziert. Dadurch wird das Epitop MCC<sub>93-103</sub> im Kontext des MHC-II-Moleküls H-2E<sup>k</sup> präsentiert (Obst et al., 2005). Eine schematische Darstellung der beiden Transgene kann der **Abb. 3A** entnommen werden.

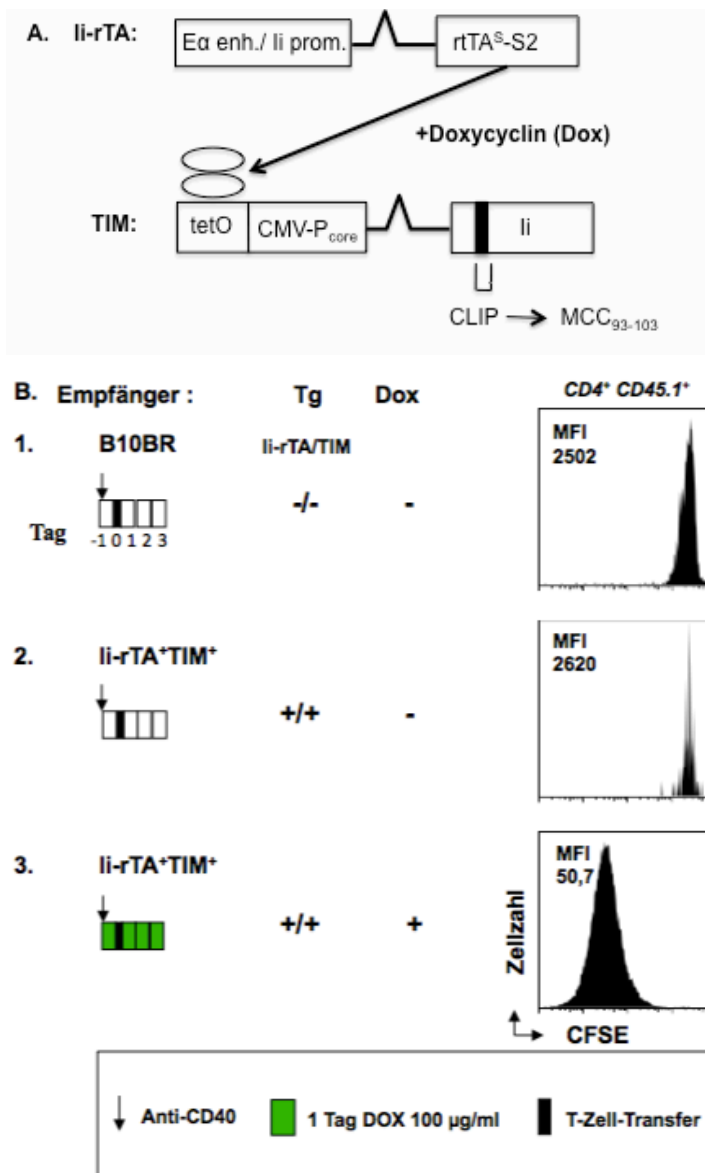
In der **Abb. 3B** wird die Antigenpräsentation in den doppelt-transgenen Tieren veranschaulicht. In dem dargestellten Experiment wurden drei verschiedene Empfängertiere verwendet. Empfängertier 1 ist Transgen-negativ, Empfänger 2 ist ein unbehandeltes und Empfänger 3 ein mit 100 µg/ml Doxycyclin-Trinkwasser behandeltes doppelt-transgenes Empfängertier. Am Tag -1 wurden alle Tiere mit einem Antikörper gegen CD40 behandelt (siehe Kapitel 2 (Materialien und Methoden)). Die Bindung dieses Antikörpers an CD40 auf der Oberfläche der DCs induziert ihre Aktivierung und eine transient erhöhte Expression von MHC-II- und akzessorischen Molekülen wie CD80 und CD86 (Hawiger et al., 2001).

Am Tag 0 erfolgte der Transfer von  $2 \times 10^6$  AND<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Lymphknotenzellen. Diese waren zur Darstellung der Antigen-abhängigen Proliferation zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert worden. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Zellen aufgenommen wird und sich bei jeder Zellteilung gleichmäßig unter den Tochterzellen verteilt. Auf diese Weise können bei der durchflusszytometrischen Analyse die Ausgangszellen und bis zu 8 Generationen der Tochterzellen nachgewiesen werden. Der CFSE-Proliferationassay ist sowohl für in-vitro- als auch für in-vivo-Untersuchungen geeignet (Lyons and Parish, 1994).

In Transgen-negativen Empfängertieren erfolgte keine Antigenpräsentation, weshalb es zu keiner Aktivierung und Proliferation der CFSE-markierten T-Zellen kommt und die MFI erhöht bleibt (siehe **Abb. 3B1**). Auch im unbehandelten doppelt-transgenen Ii-rTA<sup>+</sup>TIM<sup>+</sup> Empfängertier erfolgt keine Antigenpräsentation und folglich keine Proliferation der transferierten T-Zellen (siehe **Abb. 3B2**).

Im  $\text{Ii-rTA}^+\text{TIM}^+$  doppelt-transgenen Tier, das über die 4 Tage mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin im Trinkwasser behandelt wurde, kommt es zur Präsentation von  $\text{MCC}_{93-103}/\text{H-2E}^k$ -Komplexen zur Proliferation angeregt, sodass der Farbstoff unter den Tochtergenerationen verdünnt wird und die MFI sinkt (siehe **Abb. 3B3**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das von den AND-TCR-transgenen T-Zellen erkannte Antigen nur in doppelt-transgenen Mäusen und nur unter Behandlung mit Doxycyclin präsentiert wird. Diese Ergebnisse stimmen mit der Erstbeschreibung der Tiere überein (Obst et al., 2005).



**Abb. 3. Nachweis der Induzierbarkeit der Antigenpräsentation durch Doxycyclin mithilfe spezifischer T-Zellen.**

**A. Schematische Darstellung des doppel-transgenen (dtg) Systems.**

Die doppel-transgene Mauslinie li-rTA-TIM entstand durch Kreuzung der transgenen TIM-Mauslinie (Tetrazyklin induzierbare Invariante Kette mit Mottencytochrom C) mit li-rTA<sup>+</sup> Tieren.

Das Transgen (Tg) li-rTA kodiert für einen MCC-Transaktivator unter der Kontrolle eines H-2Eα-Enhancers und eines li-Promotors, der in der Gegenwart von Doxycyclin das zweite Transgen anschaltet. Dadurch wird das Epitop MCC<sub>93-103</sub>/E<sup>k</sup> präsentiert (Obst et al., 2005).

**B. Genexpression in den Empfängertieren. Die Antigenpräsentation erfolgt in doppeltransgenen Tieren nur unter Doxycyclinbehandlung**

**1:** Tg<sup>-</sup> Empfängertier: Hier erfolgt keine Antigenpräsentation, weshalb keine Proliferation der mit CFSE-markierter T-Zellen aus einer AND-TCR-transgenen Maus nachweisbar ist. Die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) bleibt unverändert.

**2:** Unbehandeltes doppel-transgenes (dtg) Empfängertier. Auch in diesem Fall erfolgt keine Antigenpräsentation und folglich keine Proliferation der transferierten T-Zellen. Die MFI bleibt wie bei nicht-transgenen Kontrolltieren unverändert.

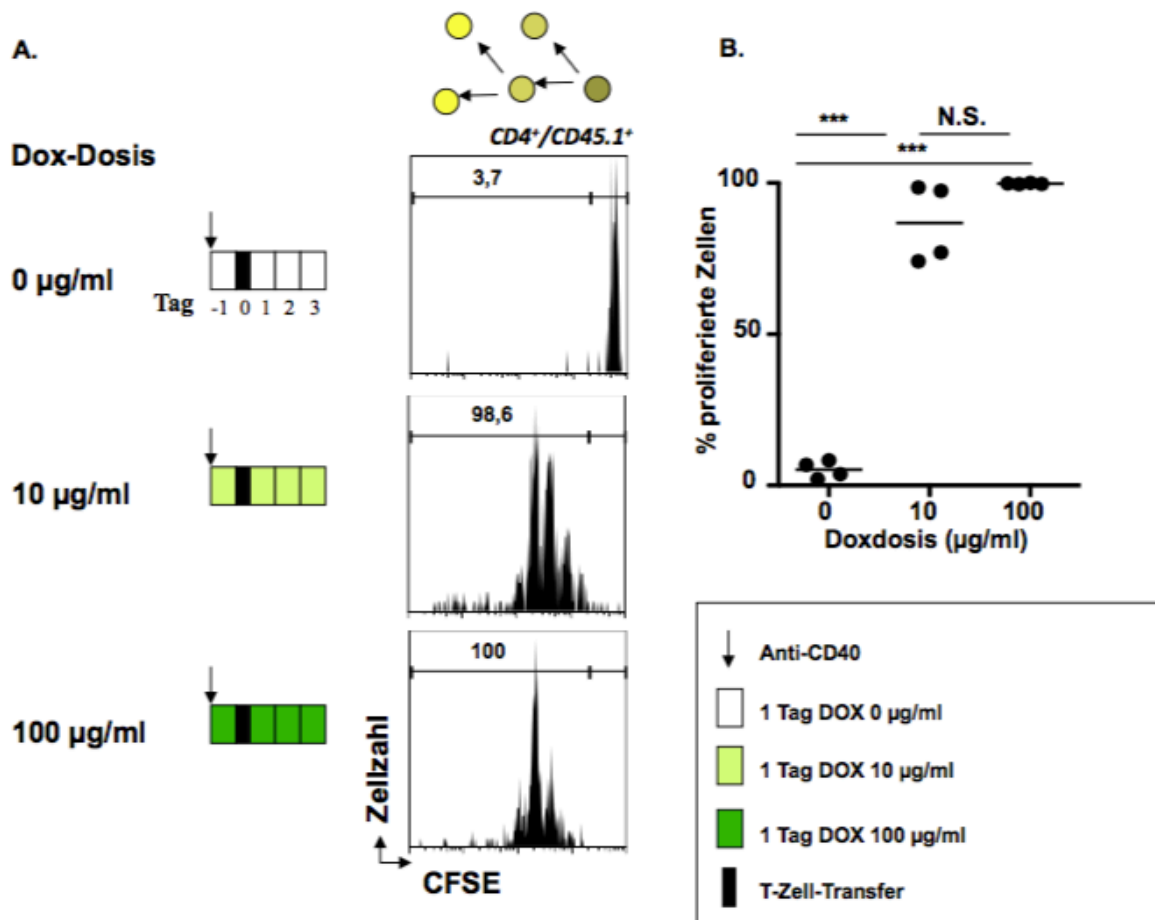
**3:** Doppel-transgene Mäuse werden über vier Tage mit 100 µg Doxycyclin pro ml Trinkwasser behandelt. Unter Behandlung mit Doxycyclin (Dox) wird das Antigen (Ag) MCC<sub>93-103</sub>/E<sup>k</sup> auf den APCs präsentiert. Dieses wird spezifisch von CD4<sup>+</sup> AND T-Zellen erkannt. Nach Antigenkontakt proliferieren die T-Zellen, das CFSE wird unter den Tochtergenerationen verdünnt, die MFI sinkt.

#### 4.2. Änderung der Doxycyclindosis - Änderung der Antigenpräsentation?

Mithilfe des auf CFSE-Verdünnung beruhenden Proliferationsassays wollten wir nun ermitteln, welche Doxycyclin-Dosis geeignet ist, quantitativ geringere Antigenpräsentation in vivo zu induzieren. Eine solche Antigendosis in den Experimenten entspricht idealerweise der niedrigsten Antigenmenge, bei der sich die spezifischen T-Zellen reproduzieren gerade noch teilen. Zur Ermittlung dieser Doxycyclin-Konzentration im Trinkwasser, wurden Vorversuche durchgeführt, die auf früheren Ergebnissen beruhten (Obst et al., 2005).

Doppelt-transgene Tiere wurden über 4 Tage mit Doxycyclin-Konzentrationen im Trinkwasser von 0, 5, 10, 20 und 100 µg/ml behandelt. Am Tag vor dem T-Zell-Transfer, Tag -1, begann die Behandlung mit Doxycyclin, da zuvor gezeigt wurde, dass die TIM-Genexpression bereits innerhalb weniger Stunden nach Doxycyclin-Gabe nachweisbar ist (Obst et al., 2005), zeitgleich wurde einmalig 50 µg eines agonistischen Antikörpers gegen CD40 in 100 µl PBS zur Aktivierung der DCs intraperitoneal (i.p.) injiziert. Am Tag 0 wurden  $2 \times 10^6$  naive, CFSE markierte AND  $CD4^+/CD45.1^+$  Zellen intravenös (i.v.) transferiert und am Tag 3 die Teilungsrate der adoptiv transferierten  $CD4^+$  T-Zellen ermittelt. Die niedrigste Doxycyclin-Konzentration, die reproduzierbar zur Teilung CFSE-markierter T-Zellen führte, betrug 10 µg/ml. Bei 0 µg/ml proliferierten die Zellen in keinem der Experimente. In den Experimenten AA10 und AA28 teilten sich die Zellen unter Behandlung mit 5 µg/ml, Experiment AA11 nicht. In allen drei Versuchen teilten sich sämtliche Zellen sowohl unter 20 µg/ml als auch unter 100 µg/ml Doxycyclin.

In der **Abb. 4A** ist eine beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen der Experimente zur Dosisermittlung dargestellt. In der **Abb. 4B** ist die statistische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. In Tieren, die kein Doxycyclin erhalten, findet keine Teilung der Zellen statt, unter der Behandlung mit Doxycyclin in der Konzentration von 10 und 100 µg/ml im Trinkwasser kommt es jedoch zu vollständiger Teilung der  $CD4^+$  T-Zellen in allen durchgeführten Experimenten. Der prozentuale Anteil geteilter T-Zellen unterscheidet sich unter Behandlung mit 10 und 100 µg/ml Doxycyclin nicht signifikant. Bemerkenswert ist allerdings das wiederholt beobachtete inhomogene Teilungsmuster der Zellen unter der Behandlung mit 10 µg/ml. Eine mögliche Interpretation ist, dass diese Zellen als weniger synchronisierte Kohorte stimuliert wurden, da sie wegen geringerer Antigen- oder APC-Dichte mehr Zeit benötigen, den zur Aktivierung erforderlichen Schwellenwert zu überwinden (Henrickson et al., 2008)



**Abb. 4. Ermittlung der niedrigsten Doxycyclin-Konzentration, die in doppelt-transgenen Tieren reproduzierbar zu Antigenpräsentation und damit zu T-Zell-Proliferation führt.**

Die niedrigste Doxycyclindosis, die zu reproduzierbarer Antigenpräsentation führt beträgt 10 µg/ml.

**A.** Behandlung doppelt-transgener Empfängertiere mit Doxycyclin,

Die Empfängertiere erhielten Trinkwasser mit Doxycyclin in Konzentrationen von 0, 10 und 100 µg/ml. Am Tag -1 erfolgte die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 50 µg eines Anti-CD40-Antikörpers (senkrechter Pfeil). Am Tag 0 erfolgte der Transfer CFSE-markierter AND T-Zellen. Am Tag 3 wurden die Milzzellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> AND T-Zellen.

**B.** Statistik über 4 unabhängige Experimente, wobei der Prozentsatz der AND T-Zellen gezeigt ist, die sich mindestens einmal geteilt haben.

Keine Teilung der Donorzellen unter Behandlung mit 0 µg/ml. Nahezu 100 Prozent der Donorzellen teilen sich unter der Behandlung mit 10 µg/ml. Statistisch signifikanter Unterschied der Teilungsraten zwischen den Gruppen die mit 0 und 10 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser behandelt wurden (\*\*\*)  $p < 0,0005$ . Volle Teilung unter der Behandlung mit 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser. Nicht signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen die 10 und 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser erhielten (N.S.  $p \geq 0,05$ ).

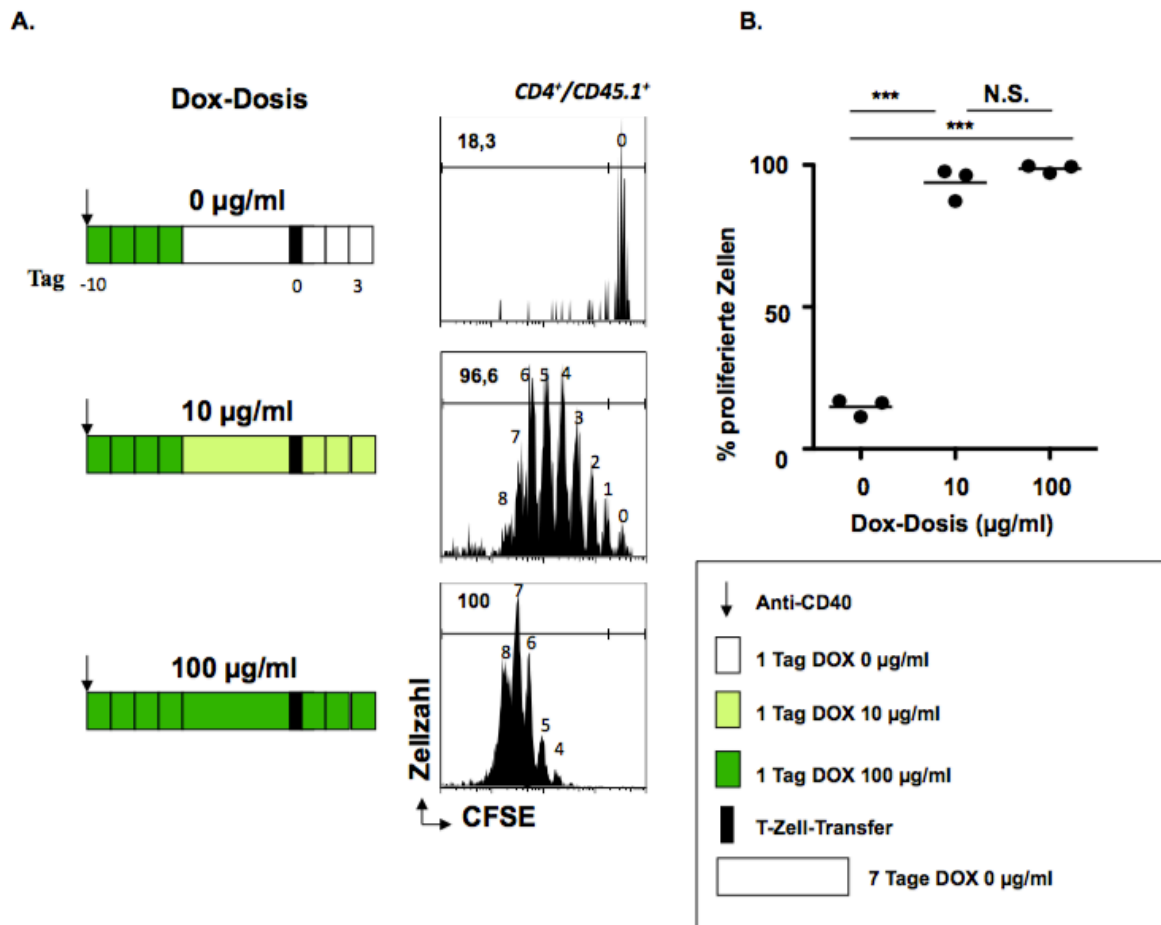
#### **4.3. Nachweis der reduzierten Präsentation des Antigens durch die Reduktion der Doxycyclin-Dosis in Mäusen der Ii-rTAxTIM-Linie nach vorausgehender hochdosierter Doxycyclin-Gabe**

Um zu ermitteln, ob sich die Antigenpräsentation nach Doxycyclin-Reduktion innerhalb von sieben Tagen anpasst, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Wie der Abbildung 5 entnommen werden kann, wurden drei Empfängertiere der Ii-rTAxTIM-Linie über 4 Tage mit 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser behandelt, anschließend erfolgte entweder eine Reduktion der Doxycyclin-Konzentration im Trinkwasser auf 0 oder 10 µg/ml oder die Behandlung wurde mit 100 µg/ml für 10 Tage weitergeführt. Dabei bezeichneten wir die 4-tägige Phase, in der alle Tiere Trinkwasser mit hoher Doxycyclin-Konzentration erhielten als Primingphase, denn in dieser Zeit kommt es zu T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung (Obst et al., 2005). Die variable Phase bezeichneten wir als Erschöpfungsphase, da zuvor gezeigt worden war, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen bereits nach 10 Tagen kontinuierlicher Antigenpräsentation dysfunktional werden (Brooks et al., 2005; Han et al., 2010). Am Tag 0 fand der adoptive Transfer CFSE-markierter AND T-Zellen statt und am Tag 3 wurden die Milzzellen im Durchflusszytometer analysiert.

In der **Abb. 5A** ist erkennbar, dass sich die Zellen 7 Tage nach dem Absetzen von Doxycyclin nicht mehr teilen. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen (Obst et al., 2005; Obst et al., 2007) überein und besagt, dass sowohl Doxycyclin als auch MCC<sub>93-103</sub>/E<sup>k</sup>-Komplexe nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar sind. Die Teilungsraten spezifischer Zellen unter 10 und 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser sind zwar verschieden, es teilt sich die große Mehrheit der Zellen. Die verschiedenen CFSE-Muster können bedeuten, dass sich die Zellen unter hoher Doxycyclin-Dosis schneller als unter niedriger teilen oder dass die Zellen bei niedriger Dosis später beginnen sich zu teilen.

In der **Abb. 5B** findet sich die statistische Zusammenfassung aller drei Versuche, jeder Punkt der Graphik steht für ein Versuchstier. Die prozentualen Anteile proliferierter Zellen unter Behandlung mit 100 µg/ml und 10 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser unterscheiden sich signifikant von dem Anteil proliferierter Zellen unter 0 µg/ml. Der Unterschied zwischen 10 und 100 µg/ml ist jedoch statistisch nicht signifikant. Dieses Experiment zeigt, dass die Antigenpräsentation durch die Änderung der Doxycyclin-Behandlung in der Erschöpfungsphase, selbst nach einer hochdosierten Doxycyclin-Behandlung während der Primingphase reduziert wird. Die Antigenpräsentation welche unter der Behandlung mit 100 µg/ml auf den DCs induziert wurde wird offenbar durch eine spätere Reduktion der Doxycyclin-Dosis herunterreguliert.





**Abb. 5. Nachweis einer reduzierten Antigenpräsentation nach Reduktion der Doxycyclin-Dosis in doppelt-transgenen Rezipienten.**

**A.** Nach einer anfänglichen hochdosierten Behandlung mit 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser über 4 Tage wurden die Empfängertiere über 10 Tage mit den angegebenen Konzentrationen Doxycyclin behandelt. Der Beginn der Doxycyclin-Behandlung, sowie die Behandlung der Tiere mit 50 µg eines Anti-CD40-Antikörpers (senkrechter Pfeil) erfolgten am Tag -10. Der adoptive Transfer von CFSE-markierten Lymphknotenzellen einer CD90.1 AND-transgenen Maus erfolgte 10 Tage später, am Tag 0. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der adoptiv transferierten AND T-Zellen am Tag 3. Es konnte keine Teilung der T-Zellen im unbehandelten Empfänger auch nach vorausgegangener hochdosierter Behandlung nachgewiesen werden.

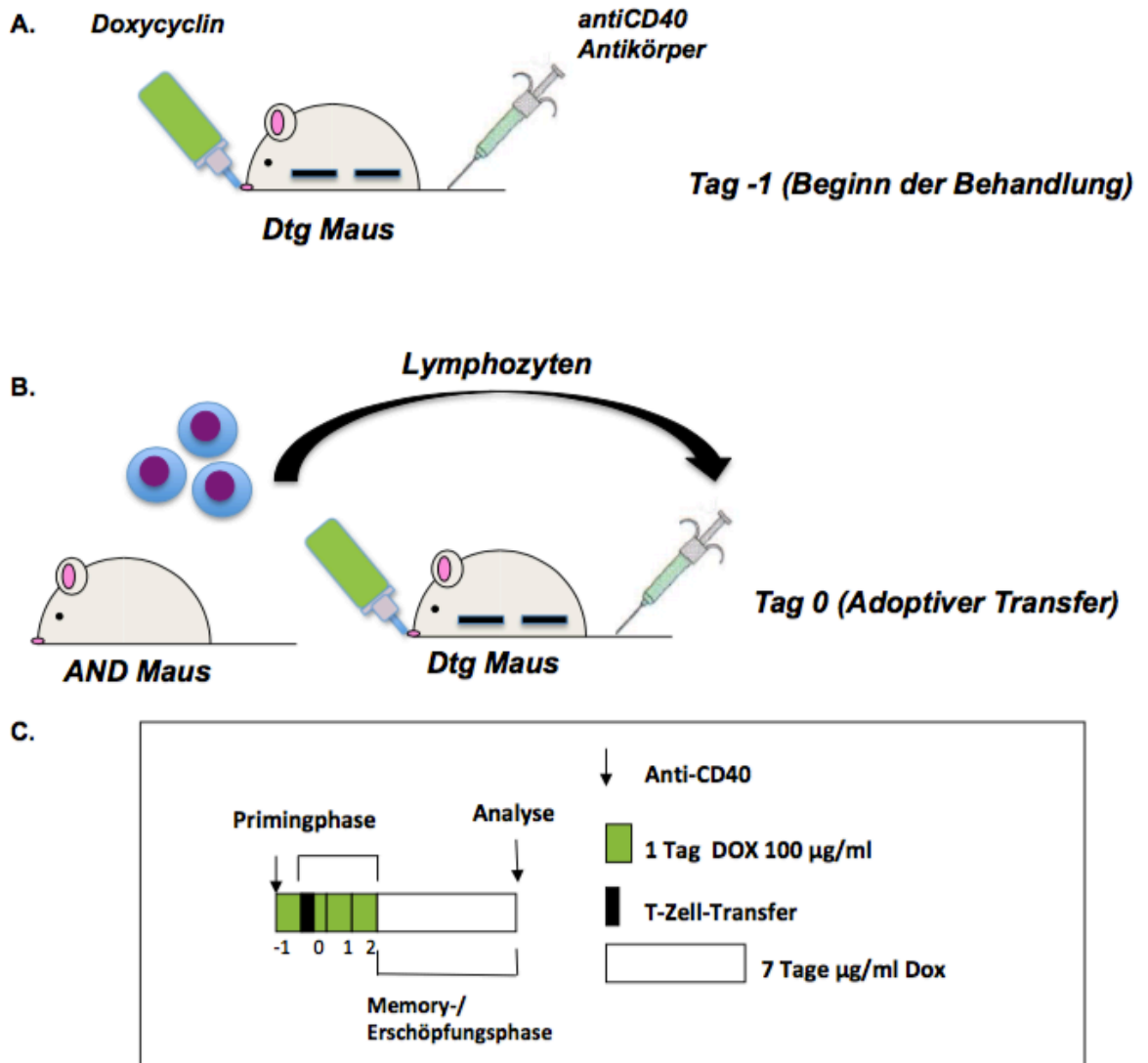
Unter der Behandlung mit 10 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser teilen sich die T-Zellen 1-8 Mal. In der Analyse sind die Generationen 0-8 sichtbar. Unter Behandlung mit 100 µg/ml Doxycyclin teilen sich die Zellen 4-8 Mal. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Menge des präsentierten Antigens unter Reduktion der Doxycyclin-Dosis entsprechend reduziert.

**B.** Statistische Zusammenfassung von unabhängigen Experimenten, wobei jeder Punkt der Graphik ein Versuchstier repräsentiert. Die prozentualen Anteile proliferierter Zellen unter Behandlung mit 100 µg/ml und 10 µg/ml Doxycyclin unterscheiden sich signifikant von dem Anteil proliferierter Zellen unter 0 µg/ml Doxycyclin (\*\* $p < 0,0005$ ). Der Unterschied zwischen den Gruppen, die mit 10 und 100 µg/ml Doxycyclin behandelt wurden, ist dagegen statistisch nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

#### **4.4. Untersuchung des Proliferationsverhaltens von T-Zellen nach 7-tägiger**

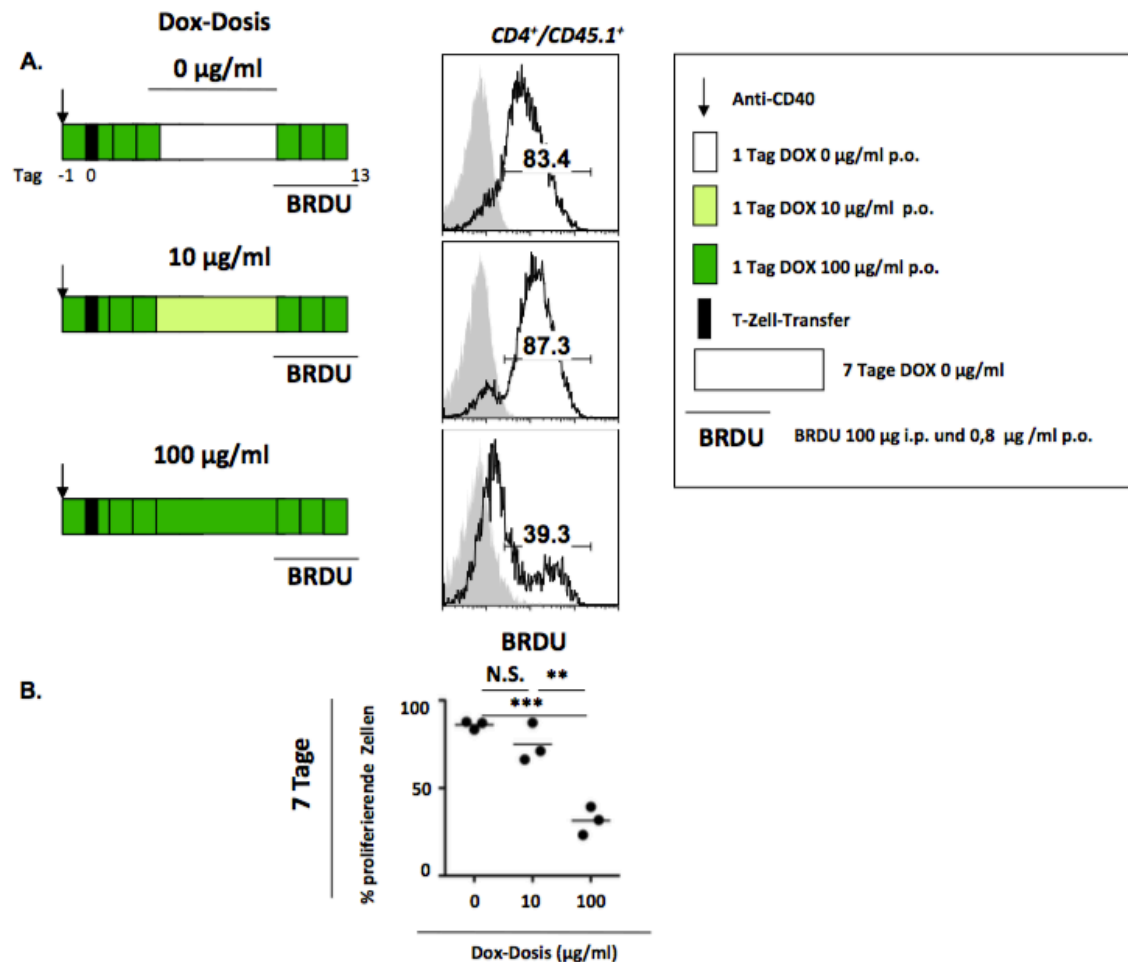
##### **Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen**

Im nächsten Schritt wurde das Proliferationsverhalten spezifischer T-Zellen nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase untersucht. Nachdem die Zellen in allen Empfängertieren im gleichen Maße während der 3-tägigen Priming-Phase aktiviert wurden, folgte eine variable 7-tägige Erschöpfungsphase. Es war zuvor gezeigt worden, dass AND-T-Zellen nach 10 Tagen persistierender Antigenpräsentation ebenso dysfunktional sind wie nach 30 Tagen (Han et al., 2010). In der Erschöpfungsphase wurde wieder die Doxycyclindosis variiert, um den Einfluß der Antigenmenge auf die Schwelle der T-Zell-Erschöpfung zu untersuchen. Der allgemeine Versuchsablauf ist der **Abb. 6** zu entnehmen. In diesem ersten Versuch sollte die Proliferationskapazität der T-Zellen ab Tag 10 des Experiment bestimmt werden. Um diese messen zu können, wurden die Empfänger ab Tag 10 nochmals mit hoher Doxycyclindosis stimuliert, parallel erfolgte eine einmalige intravenöse Injektion von 100 µg BrdU in 100 µl PBS und orale Gabe von 0,8 µg/ml BrdU im Trinkwasser über 72 Stunden. BrdU ist ein Nukleotidanalogen, dass bei DNA-Synthese anstelle von Thymidin eingebaut wird und in Tochterzellen, die sich seit BrdU-Verabreichung ein- oder mehrmals geteilt haben, mithilfe eines Antikörpers quantitativ nachweisbar ist. In der **Abb. 7a** ist eine für dieses Experiment typische BrdU-Färbung dargestellt, in der DNA der Antigen-spezifischen Lymphozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt ist. **Abb. 7b** zeigt die statistische Auswertung angeführt von drei unabhängigen Experimenten, wobei jeder Punkt der Graphik ein Versuchstier repräsentiert. Aus den in der **Abb. 7** dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass es zu einer statistisch signifikanten Einschränkung der Proliferationsfähigkeit Antigen-spezifischer Lymphozyten nach einer hochdosierten Doxycyclin-Behandlung in der Erschöpfungsphase kommt. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Proliferationskapazität der T-Zellen bei niedriger Doxycyclindosis nicht signifikant von der Teilungskapazität der Gedächtniszellen. Somit führt eine hohe Antigendosis zur Reduktion des Proliferationsverhaltens antigenspezifischer T-Zellen nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase und während eine niedrige Antigen-Dosis in dieser Zeit das Proliferationsverhalten nicht beeinflusst.



**Abb. 6. Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuche in den Abb. 7-9**

- A. Zu Beginn des Experiments (Tag -1) wurde die Behandlung mit Doxycyclin 100 µg/ml im Trinkwasser gestartet. Einmalig wurden zur Aktivierung der dendritischen Zellen 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers in 100 µl PBS injiziert (senkrechter Pfeil).
- B. Am Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer der TCR-transgenen AND-T-Zellen in den doppeltransgenen Empfänger. Dazu wurden die Lymphknoten-Zellen der AND-transgenen Mäuse gewonnen, wie im Kapitel 2. Materialien und Methoden verarbeitet und als Einzelzellsuspension in die Schwanzvene des Empfängers injiziert.
- C. Schematische Darstellung des Behandlungsplans: Die Behandlung mit Doxycyclin wird für vier Tage durchgeführt, jedes kleine rechteckige Kästchen steht dabei für einen Tag; diese 4-tägige Behandlungsphase bezeichnen wir als Primingphase, weil während dieser Zeit die T-Zellen aktiviert werden. Darauf folgte eine variable Erschöpfungsphase von 7 Tagen, ein großes rechteckiges Kästchen steht für 7 Tage. Anschließend wurden die T-Zellen aus den Milzen gewonnen, wie im Kapitel 2. Materialien und Methoden verarbeitet und durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 7. Untersuchung des Proliferationsverhaltens adoptiv transferierter AND T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen: reduziertes Proliferationsverhalten, nach hoher Antigen-Exposition, nicht jedoch nach niedriger Antigen-Exposition.**

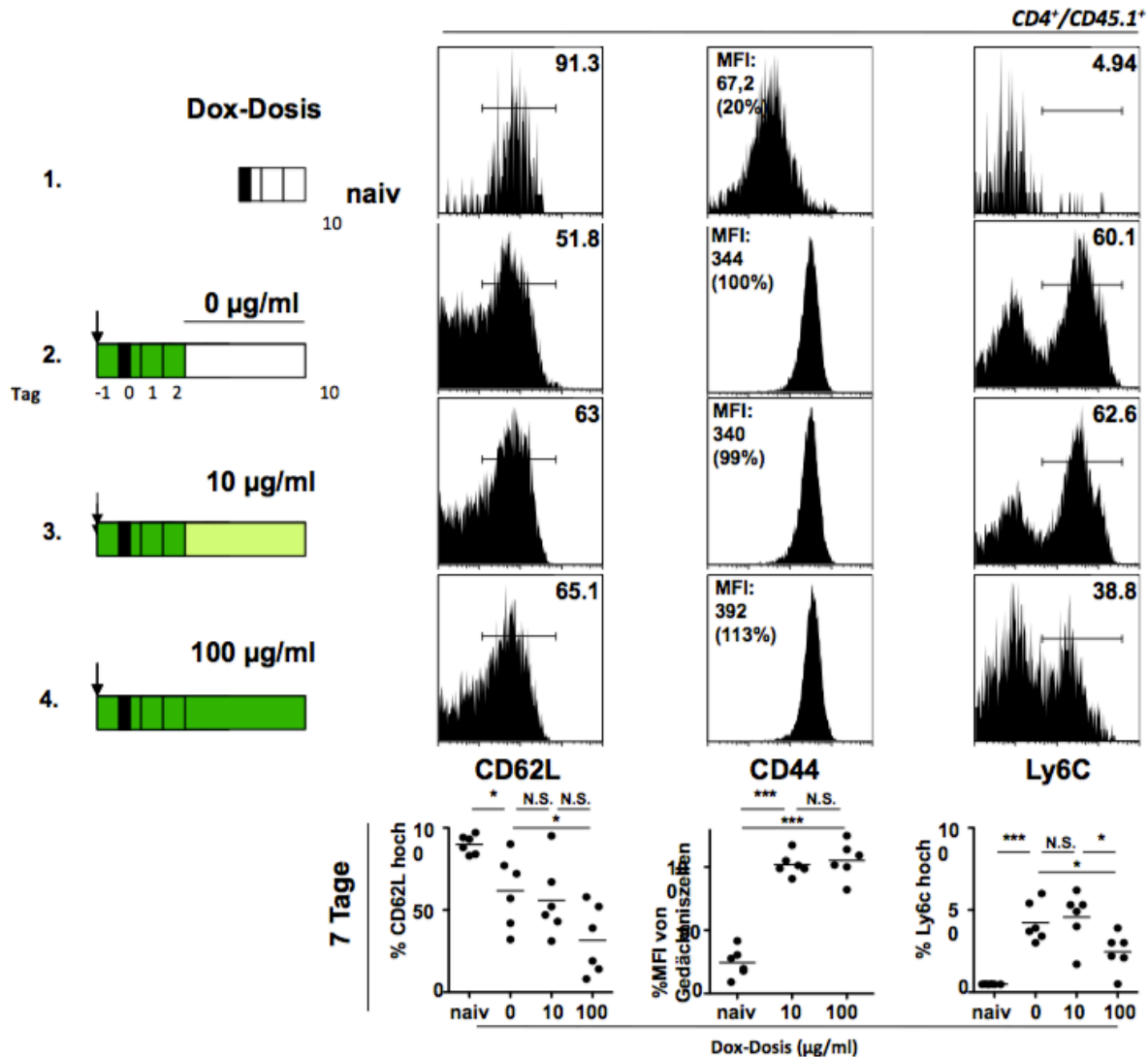
**A.** Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 7 Tagen wurde Doxycyclin in der angegebenen Konzentration verabreicht. Der adoptive Transfer von AND 45.1<sup>+</sup> TCR-transgenen T-Zellen erfolgte am Tag 0. An Tagen 10 bis 12 wurden die Tiere mit 100 µg BrdU intravenös, sowie 0,8 µg/ml BrdU und 100 µg/ml Doxycyclin p.o. behandelt. Am Tag 13 wurde das in die DNA der Milzlymphozyten eingebaute BrdU mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt (siehe Kapitel 2. Materialien und Methoden) und durchflusszytometrisch untersucht (schwarze Linie). In grau dargestellt ist die Färbung mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper.

**B.** Statistische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Maus pro Bedingung. Es ist ein signifikanter Unterschied (\*\*\*)  $p < 0,0005$  im Proliferationsverhalten zwischen T-Zellen nach hoher Antigen-Exposition einerseits und niedriger Antigen-Exposition und Gedächtniszellen andererseits zu erkennen. Die Zellen mit niedriger Antigen-Exposition unterschieden sich in ihrem Proliferationsverhalten nicht signifikant von Gedächtniszellen (N.S.  $p \geq 0,05$ ).

#### 4.5. Ermittlung des Aktivierungszustandes antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigenendosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen

Aus den oben genannten Beobachtungen ergab sich die Frage, ob sich die T-Zellen in unserem Modell nach hochdosierter und niedrigdosierter Antigenstimulation von unstimulierten Zellen und Gedächtniszellen in Bezug auf Expression von Aktivierungsmarkern unterscheiden. Wir untersuchten daraufhin die Expression von CD62L, CD44 und Ly6C auf der Oberfläche antigenspezifischer T-Zellen. CD62L wird auf T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten exprimiert und ist ein verbreiteter Marker für naive T-Zellen. CD44 hingegen wird nach Kontakt mit Antigen heraufreguliert. Der Phänotyp CD44<sup>hoch</sup>/CD62L<sup>niedrig</sup> zeichnet somit Effektor- und Gedächtniszellen aus. Ly6C wurde in der Maus als ein später Gedächtniszellmarker beschrieben (Tokoyoda et al, 2009). Die **Abb. 8** zeigt eine beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von AND-transgenen adoptiv transferierten Zellen aus doppelt-transgenen Versuchstieren, die nach dem in **Abb. 6** beschriebenen Schema behandelt wurden. IrTAXTIM Empfängertiere wurden von Tag -1 bis Tag 3 mit 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser behandelt, in den darauffolgenden 7 Tagen erhielten sie Doxycyclin in den angegebenen Konzentrationen. Der adoptive Transfer von Lymphknotenzellen TCR-transgener AND<sup>+</sup> 45.1<sup>+</sup> bzw. 90.1<sup>+</sup> Tiere fand am Tag 0 statt. Am Tag 10 wurden die obengenannten Oberflächenmarker auf den transferierten Zellen in der Milz durchflusszytometrisch untersucht. Zu beobachten war eine hohe Expression von CD62L auf der Oberfläche von nahezu allen naiven T-Zellen, nach Antigenkontakt kam es zu einer Herunterregulation des Moleküls. Die Expression von CD62L auf Zellen, die mit einer geringen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase konfrontiert waren, unterschied sich nicht signifikant von der Expression auf Gedächtniszellen, ein signifikanter Unterschied zu Gedächtniszellen war nur nach einer Stimulation mit hoher Antigenmenge zu beobachten. Im Hinblick auf die CD44-Expression unterschieden sich die naiven Zellen deutlich von allen Zellen mit Antigenkontakt, wobei die Menge des Antigens in der Erschöpfungsphase keine Rolle spielte. Auch Ly6C wurde auf der Oberfläche von Gedächtniszellen heraufreguliert. Wenn das Antigen in der Erschöpfungsphase in hoher Menge vorhanden ist, konnte eine reduzierte Expression des Markers nachgewiesen werden, nicht jedoch bei niedriger Antigenmenge in der Erschöpfungsphase. Diese Unterschiede sind am Tag 10 zu sehen, werden aber in späteren Experimenten am Tag 30 deutlicher (siehe **Abb. 11**). Bemerkenswert ist, dass sich am Tag 10 die Regulation des Gedächtniszellmarkers in den mit 0 und 10 µg Doxycyclin pro ml Trinkwasser behandelten Tieren nicht unterscheiden. Dies kann

bedeuten, dass zu diesem Zeitpunkt eine geringe Menge persistierten Antigens die Differenzierung von Gedächtniszellen nicht hemmt.



**Abb. 8. Ermittlung des Aktivierungszustandes der T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigen dosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 7 Tagen wurde Doxycyclin in der angegebenen Konzentration verabreicht. Der adoptive Transfer von AND 45.1<sup>+</sup> TCR-transgenen T-Zellen erfolgte am Tag 0. Am Tag 10 wurde die Expression der Oberflächenmarker CD62L, CD44 und Ly6C auf den Milzzellen der Empfängertiere untersucht.

CD62L wird auf Zellen, die keinen Antigenkontakt hatten exprimiert, CD44 wird nach Kontakt mit Antigen hochreguliert, Ly6C ist ein später Gedächtniszellmarker.

Der adoptive Transfer von 45.1<sup>+</sup> bzw 90.1<sup>+</sup> TCR-transgenen AND-T- Zellen in die Transgen-negativen Kontrolltiere fand erst am Tag 7 statt, da die transferierten Zellen in Abwesenheit von Antigen schnell verschwinden.

Zu beobachten war eine hohe Expression von CD62L auf der Oberfläche von naiven T-Zellen (Empfänger 1), nach Antigen-Kontakt kam es zu einer Herunterregulation des Moleküls (Empfänger 2-4). Die Expression auf Zellen, die mit einer geringen Menge Antigen in der Erschöpfungsphase (Empfänger 3) konfrontiert waren, unterschieden sich nicht signifikant (N.S.,  $p \geq 0,05$ ) von den Gedächtniszellen (Empfänger 2); ein signifikanter Unterschied (\* $p < 0,05$ ) zu Gedächtniszellen (1) war nach der Stimulation mit der hohen Antigenmenge zu beobachten (Empfänger 4).

Im Hinblick auf die CD44-Expression unterschieden sich die naiven Zellen (1) signifikant (\*\* $p < 0,0005$ ) von Zellen, die Antigen-Kontakt hatten (2-4), jedoch spielte die Menge des Antigens in

der Erschöpfungsphase keine Rolle.

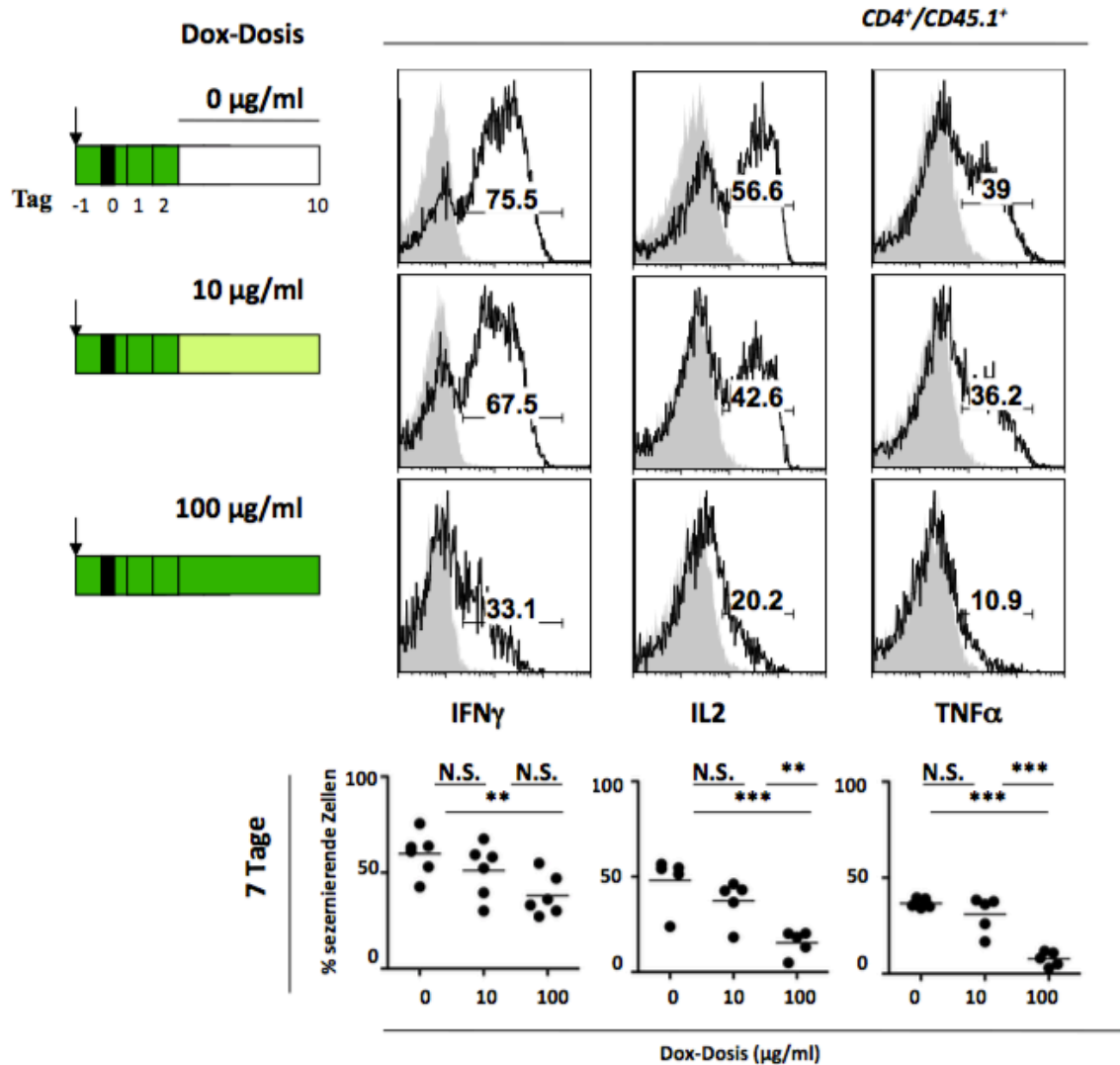
Auch Ly6C wird nach Antigenkontakt auf der T-Zell-Oberfläche hochreguliert, ist das Antigen in der Erschöpfungsphase in hoher Menge vorhanden, kommt es zu einer reduzierten Expression des Markers. Eine signifikante ( $*p<0,05$ ) Reduktion ist unter Behandlung mit einer hohen Doxycyclin-Dosis (4) im Vergleich zu einer niedrigen Doxycyclin-Dosis (3) und zu Gedächtniszellen (2) zu verzeichnen.



#### **4.6. Messung der Zytokinsekretion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> nach 7-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen**

Als Nächstes fragten wir uns, ob sich die chronische Antigenstimulation und die Menge des Antigens auf die Funktionalität der Zellen auswirkt. Dabei wollten wir vor allem die Kapazität der Zellen untersuchen, Zytokine zu produzieren und damit andere Zellen zu rekrutieren und zu aktivieren. Dazu haben wir die AND-transgenen transferierten Zellen, aus den nach dem in **Abb. 6** beschriebenen Schema behandelten Ii-rTAxTIM Empfängertiere nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase isoliert und in vitro mit PMA und Ionomycin, wie im Kapitel Materialien und Methoden beschrieben, stimuliert. Anschließend wurden intrazellulär die Effektorzytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 gefärbt. Diese Zytokine, die üblicherweise von Th1-Zellen sezerniert werden, wirken als Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren, und direkte antivirale Zytokine.

Eine beispielhafte Darstellung der Daten findet sich in der **Abb. 9**. Alle Tiere wurden während der 4-tägigen Primingphase mit Doxycyclin in der Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  behandelt. Die erste Gruppe der Empfängertiere erhielt während der darauffolgenden 7-tägigen Erschöpfungsphase kein Doxycyclin, die zweite Gruppe Doxycyclin im Trinkwasser in der Konzentration 10  $\mu\text{g/ml}$ , die dritte 100  $\mu\text{g/ml}$ . Der untere Teil der **Abb. 9** zeigt die statistische Auswertung von 6 unabhängigen Experimenten zur IFN $\gamma$ -Produktion und jeweils 5 Experimenten zur Produktion von TNF $\alpha$  und IL-2. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Sekretion aller Zytokine unter hoher Antigenpersistenz, wobei die Suppression von IL-2 und TNF $\alpha$  stärker ausgeprägt war als die von IFN $\gamma$ . T-Zellen, die mit einer hohen Antigendosis während der Erschöpfungsphase konfrontiert waren, produzierten signifikant weniger TNF $\alpha$  und IL-2 als Lymphozyten, die einer geringen Antigendosis ausgesetzt wurden. Interessanterweise zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IFN $\gamma$ -Produktion. Die Zytokinproduktion in T-Helferzellen unter niedriger Antigendosis unterschied sich nicht signifikant von der Zytokinproduktion durch die Gedächtniszellen. Insgesamt zeigten die T-Zellen bereits nach einer 7-tägigen Phase mit einer hohen Antigenpersistenz funktionelle Beeinträchtigung, wobei Fähigkeit IL-2 und TNF $\alpha$  zu produzieren früher verloren geht als die IFN $\gamma$ -Produktion. Eine niedrige Antigendosis während einer 7-tägigen Erschöpfungsphase führt somit zu keiner relevanten Dysfunktion.



**Abb. 9. Intrazelluläre Zytokinfärbung nach 7-tägiger Erschöpfungsphase: Reduktion der Zytokinproduktion unter hoher Antigen-Exposition, jedoch nicht unter niedriger Antigen-Exposition.**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 7 Tagen erhielten sie Doxycyclin in den angegebenen Konzentrationen. Am Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 45.1<sup>+</sup> bzw. 90.1<sup>+</sup> TCR-transgenen AND-T-Zellen in die Ii-rTA-TIM-Empfänger. In dieser Abbildung sind die durchflusszytometrischen Analysen der Milzzellen nach in vitro-Stimulation mit PMA/IM und anschließender intrazellulärer Zytokinfärbung zu sehen. Dargestellt sind nur transferierte AND T-Zellen nach Färbung mit Zytokin-spezifischen (Linie) und Kontroll-Antikörpern (grau). Unten sind statistische Auswertungen von 6 unabhängigen Experimenten zur IFN $\gamma$ -Produktion und jeweils 5 Experimenten zur Produktion von TNF $\alpha$  und IL-2 gezeigt. Es zeigt sich eine leicht verminderte, statistisch jedoch nicht signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ -Produktion bei hoher und niedriger Antigendosis (N.S.  $p \geq 0,05$ ). Eine signifikante (\* $p < 0,05$ ) Reduktion der TNF $\alpha$ - und IL-2-Produktion unter hoher Antigendosis, jedoch nicht unter niedriger Antigendosis ist feststellbar (N.S.  $p \geq 0,05$ ).

Fassen wir an dieser Stelle die Ergebnisse der beschriebenen Versuchsreihen zusammen:

- a. Die Stimulation mit einer hohen Antigendosis während einer 7-tägigen Erschöpfungsphase führt zu
  - a. einer Einschränkung der Proliferationsfähigkeit spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen,
  - b. einer reduzierten Expression des Gedächtniszellmarkers Ly6C und zu
  - c. einer reduzierten Zytokinproduktion.
- b. Phänotypische und funktionelle Veränderungen sind unter niedriger Antigendosis nicht zu beobachten.

Diese Ergebnisse führten zur Frage nach der Rolle des zeitlichen Faktors bei der T-Zell-Erschöpfung. Deshalb verlängerten wir die Dauer der Erschöpfungsphase von 7 auf 28 Tage.

#### **4.7. Untersuchung des Proliferationsverhaltens antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 28-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen**

Zunächst untersuchten wir die Proliferationskapazität AND-transgener adoptiv transferierter Zellen nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase. Wir gingen dabei wie in **Abb. 6** beschrieben vor, verlängerten jedoch die Dauer der variablen Erschöpfungsphase auf 28 Tage.

Nach Ablauf der Erschöpfungsphase wurden alle Mäuse nochmals über 72 Stunden mit 100 µg/ml Doxycyclin und 0,8 µg/ml BrdU p.o. behandelt: für eine schnelle Erreichung einer hinreichenden Konzentration von BrdU in vivo wurden einmalig 100 µg BrdU in 100 µl PBS i.v. injiziert. Am Tag 33 wurde das in die DNA der Lymphozyten eingebaute BrdU mithilfe eines Antikörpers gefärbt und quantitativ im Durchflusszytometer gemessen.

Eine beispielhafte Darstellung der BrdU-Färbung adoptiv transferierter AND T-Zellen ist in der **Abb. 10** zu sehen. Hier ist zu sehen, dass die Unterschiede im Proliferationsverhalten nach einer Verlängerung der Erschöpfungsphase deutlicher werden. Es fällt nicht nur eine Einschränkung der Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen auf, die mit einer hohen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase konfrontiert waren, sondern auch bei niedriger Antigenpersistenz. Dies zeigt deutlich, dass nicht nur die Antigenmenge für die Beeinträchtigung des Proliferationsverhaltens verantwortlich ist, sondern auch die Expositionsdauer gegenüber dem Antigen. Wenn wir Abbildungen 7 und 9 miteinander vergleichen, sehen wir, dass mit der Antigenexpositionsdauer das Proliferationsverhalten Antigen-spezifischer Zellen, welche mit einer niedrigen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase stimuliert wurden, sich dem solcher, die mit einer hohen Antigenmenge stimuliert wurden annähert.

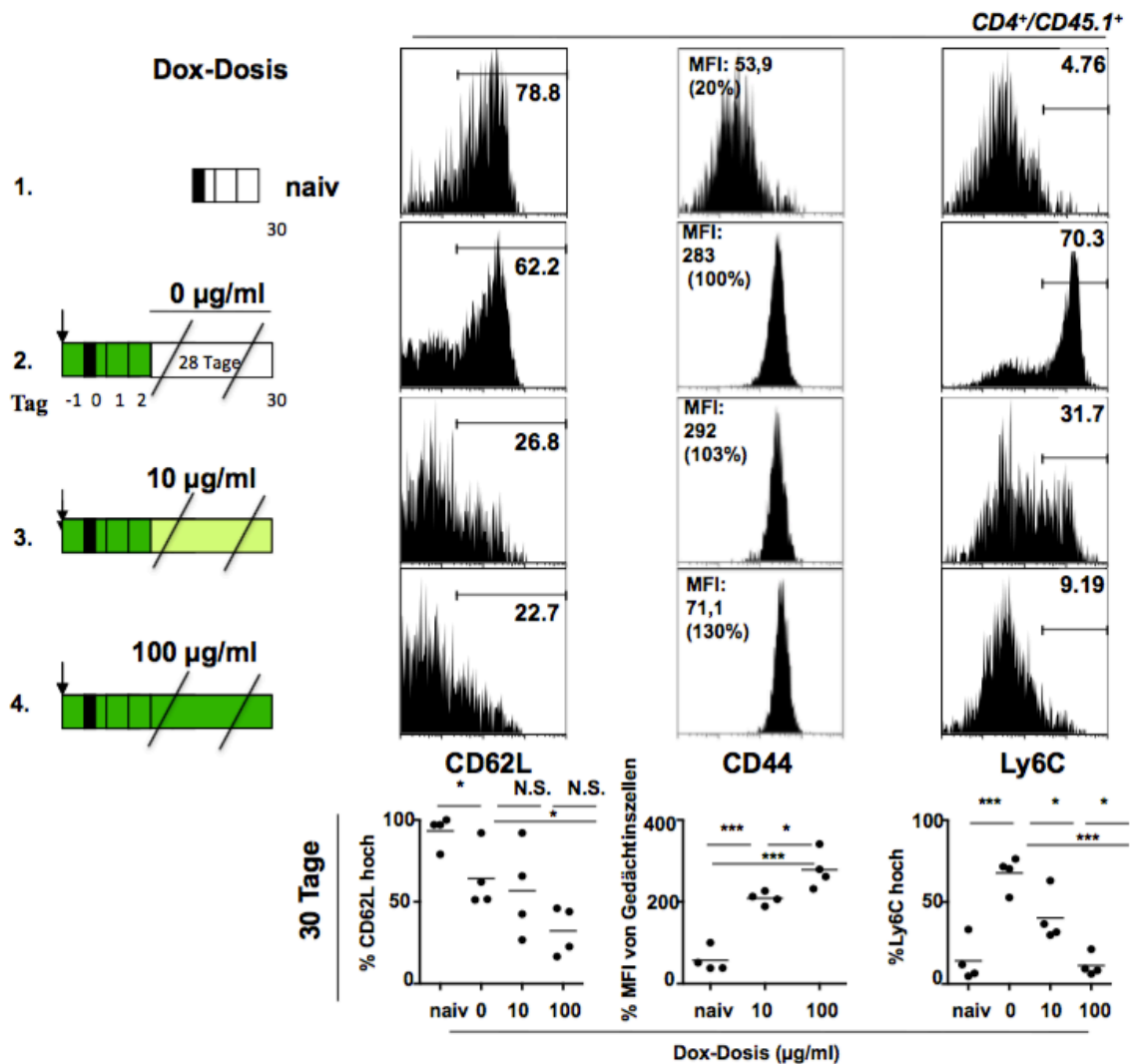


#### 4.8. Ermittlung des Aktivierungszustandes antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 28-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen

Nachdem wir die genannten Unterschiede im Proliferationsverhalten gemessen hatten, widmeten wir unsere Aufmerksamkeit den Markern CD62L, CD44 und Ly6C. Dazu wurden die genannten Moleküle auf der Oberfläche adoptiv transferierter antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Anschluss an eine 28-tägige Erschöpfungsphase gefärbt.

Ein Beispiel zur CD62L, CD44, Ly6C-Expression auf adoptiv transferierten AND T-Zellen nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen und Gedächtniszellen findet sich in der **Abb. 11**.

Analog zur 7-tägigen Erschöpfungsphase kam es nach 28 Tagen zur Herunterregulation von CD62L auf der Oberfläche antigenspezifischer T-Zellen in Tieren die während der Erschöpfungsphase Antigenkontakt hatten. Die Expression des Markers war auf naiven Zellen am höchsten, signifikant höher als auf Gedächtniszellen oder erschöpften Zellen. Die Expression von CD62L war auf Gedächtniszellen wiederum signifikant höher im Vergleich zu Zellen, die in der Erschöpfungsphase viel Antigenkontakt hatten, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Expression auf Zellen mit niedriger Antigenexposition. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Expression von CD62L zwischen Zellen mit einer hohen und einer niedrigen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase. CD62L ist also erwartungsgemäß auf naiven Zellen am höchsten und wird durch persistierenden Antigenkontakt herunterreguliert. Im Hinblick auf die CD44-Expression unterschieden sich die unstimulierten T-Zellen signifikant von den Zellen mit Antigenkontakt (niedrig auf naiven Zellen, hoch auf stimulierten Zellen). Im Gegensatz zu kürzerer Erschöpfungsphase war nach 28 Tagen ein signifikanter (\*p<0,05) Unterschied in der CD44-Expression zwischen Zellen mit hoher Antigendosis (CD44<sup>low</sup>) und Zellen mit niedriger Antigendosis (CD44<sup>high</sup>) zu sehen. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da die Expression von CD44 nach Antigenstimulation allgemein als stabil angesehen wird (Ge et al., 2002). Persistierende LCMV-Infektion kann die CD44-Expression von CD8<sup>+</sup> Zellen allenfalls senken (Wherry et al., 2007). Im Gegensatz zur 7-tägigen Erschöpfungsphase (**Abb. 8**) zeigte sich nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase eine Reduktion der Expression von dem Gedächtniszell-Marker Ly6C nicht nur auf T-Zellen mit hoher Antigenstimulation, sondern auch auf solchen mit niedriger Antigenstimulation. Insgesamt war die Expression von Ly6C auf naiven Zellen und Zellen, die mit einer hohen Antigenmenge konfrontiert waren, sehr ähnlich. Somit scheinen sich die erschöpften Zellen phänotypisch sowohl von den naiven Zellen, als auch von Effektor- und Gedächtniszellen zu unterscheiden.



**Abb.11. Ermittlung des Aktivierungszustandes der T-Zellen nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Agdosis im Vergleich zu naiven T-Zellen und Gedächtniszellen: Reduzierte Expression von Ly6C nach niedriger und hoher Antigen-Exposition.**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 28 Tagen wurde Doxycyclin in der angegebenen Konzentration verabreicht. Der adoptive Transfer von AND 45.1<sup>+</sup> TCR-transgenen Lymphknoten-T-zellen erfolgte am Tag 0. Am Tag 30 fand die Oberflächenfärbung der Milzlymphozyten aus den Empfängertieren statt. Untersucht wurde die Expression von CD62L, CD44 und Ly6C auf den CD45.1<sup>+</sup> TCR-transgenen AND T-Zellen.

**CD62L:** Herunterregulation des Moleküls nach Antigenkontakt. Die Expression auf Zellen die mit einer geringen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase konfrontiert waren unterschieden sich nicht signifikant (N.S.  $p \geq 0,05$ ) von den Gedächtniszellen oder Zellen mit hoher Antigenexposition, signifikanter Unterschied ( $*p < 0,05$ ) zu Gedächtniszellen war nach einer Stimulation mit hoher Antigenmenge zu beobachten.

**CD44:** Naive Zellen unterscheiden sich signifikant ( $***p < 0,0005$ ) von solchen mit Antigenkontakt. Ein signifikanter Unterschied ist zwischen Zellen mit hoher und niedriger Antigenexposition zu sehen. ( $*p < 0,05$ ).

**Ly6C:** Die Expression ist nach hoher und niedriger Antigen-Exposition signifikant reduziert im Vergleich zu Gedächtniszellen ( $***p < 0,0005$  und  $p < 0,01$ ).

#### **4.9. Zytokinproduktion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 28-tägiger Erschöpfungsphase mit hoher und niedriger Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen**

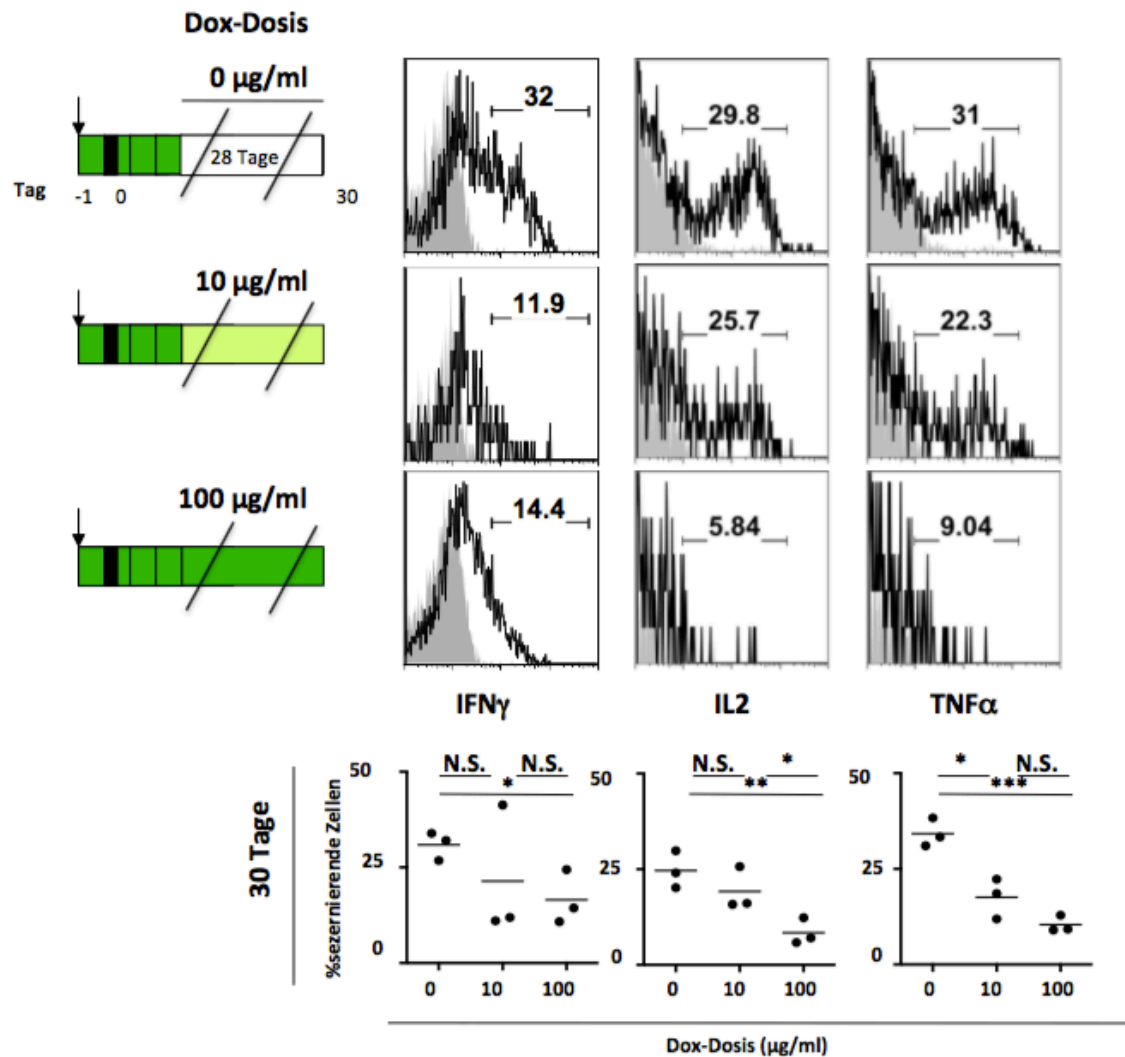
Anschließend untersuchten wir die intrazelluläre Zytokinproduktion in adoptiv transferierten AND-TCR-transgenen T-Zellen nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase. Dazu wurden die Zellen in vitro mit PMA und Ionomycin stimuliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  gefärbt.

In der **Abb. 12** sind die zytokinproduzierende Zellen im Histogramm dargestellt. Darunter findet sich die statistische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. Die erste Gruppe der Versuchstiere erhielt kein Doxycyclin in der Erschöpfungsphase, die zweite Doxycyclin in der Konzentration 10  $\mu\text{g/ml}$ , die dritte 100  $\mu\text{g/ml}$ . Es fällt auf, dass die TNF $\alpha$ -Produktion nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase, sowohl unter hoher, als auch unter niedriger Antigen-Dosis signifikant reduziert ist.

Bei der IL-2 Sekretion verhalten sich die AND T-Zellen etwas anders: die IL-2-Menge in den Gedächtniszellen und in den niedrig stimulierten Zellen sind nicht signifikant verschieden. Signifikant ist jedoch die Reduktion der IL-2-Produktion in Zellen mit hoher Antigenexposition im Vergleich zu den Gedächtniszellen.

Erkennbar ist eine signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ -Produktion bei Stimulation der T-Zellen mit hoher Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen. Die IFN $\gamma$ -Produktion unter niedriger Antigenstimulation bleibt weiterhin nicht signifikant verschieden von Gedächtniszellen und Zellen mit hoher Antigenexposition. Hierbei fällt jedoch ein Versuchstier in der Gruppe der niedrigen Doxycyclin-Konzentration auffällig aus dem Rahmen.

Insgesamt wird die Reduktion der Zytokinproduktion in der Gruppe mit der hohen Antigenstimulation nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase noch deutlicher. Die Zellen zeigen somit eine funktionelle Erschöpfung. Interessant ist auch, dass sich erstmalig ein signifikanter Unterschied in der TNF $\alpha$ -Produktion, nicht jedoch in IL-2- oder IFN $\gamma$ -Produktion zwischen Gedächtniszellen und Zellen mit niedriger Antigenstimulation zeigt. Somit scheint es eine Hierarchie im Verlust der Effektorzellfunktionen zu geben: TNF $\alpha$ -Produktion geht als erste verloren. Dies ist diskordant zu den Daten zur CD8<sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung aus Infektionsmodellen, in denen ein früher Verlust von der Fähigkeit, IL-2 zu bilden, beschrieben wird (Wherry et al., 2003).



**Abb. 12. Intrazelluläre Zytokinfärbung nach 28-tägiger Erschöpfungsphase.**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 28 Tagen wurde Doxycyclin in der angegebenen Konzentration verabreicht. Der adoptive Transfer von AND 45.1<sup>+</sup> TCR-transgenen T-Zellen erfolgte am Tag 0. Am Tag 30 fand nach einer in vitro-Stimulation mit PMA/IM die intrazelluläre Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  (schwarze Linie) statt, grau hinterlegt erscheint die Isotyp-Kontroll-Färbung. Unten in der Abbildung ist die statistische Auswertung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten zu sehen. Es war kein signifikanter Unterschied in der IFN $\gamma$ -Produktion zwischen Gedächtniszellen und T-Zellen mit niedriger Antigenexposition zu beobachten (N.S.  $p \geq 0,05$ ). Es kam zu einer signifikanten Reduktion der IFN $\gamma$ -Produktion unter hoher Antigenexposition (\* $p < 0,05$ )

Eine deutliche Reduktion der IL-2-Produktion im Vergleich zu Gedächtniszellen besteht unter hoher Antigenexposition (\*\* $p < 0,005$ ), nicht jedoch unter niedriger Antigenexposition (N.S.  $p \geq 0,05$ ).

TNF $\alpha$ -Produktion ist sowohl unter hoher als auch unter niedriger Antigenexposition im Vergleich zu Gedächtniszellen vermindert (\*\*\* $p < 0,0005$  und \* $p < 0,05$ ).

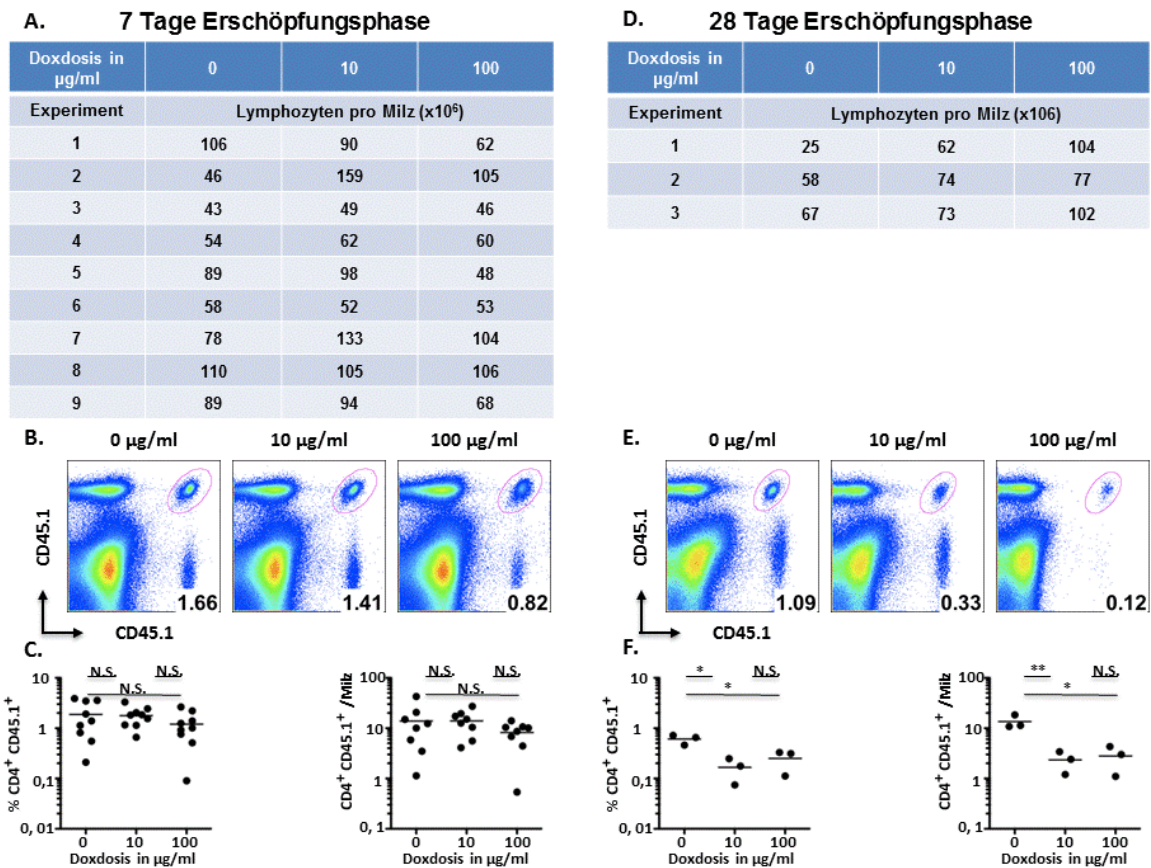


#### **4.10. Ermittlung absoluter und relativer T-Zellzahlen pro Empfängermilz. Kommt es während der Erschöpfungsphase zur Deletion der spezifischen Zellen?**

Da das Proliferationspotential der AND-transgenen T-Zellen und ihre Zytokinsynthese unter chronischer Antigen-Exposition eingeschränkt sind, fragten wir uns, ob sich dies auch in relativen und absoluten Zahlen spezifischer Zellen widerspiegelt. Bleiben die Populationen über die Zeit bestehen oder sterben die Zellen durch das Wegfallen von Überlebenssignalen, wie z.B. Herunterregulation des IL-7-Rezeptors?

Dies kann am Besten durch Berechnung der relativen und absoluten Zahlen der AND-transgenen T-Zellen unter Milzzellen ermittelt werden. Dazu haben wir die aus den Milzen der Empfängertiere gewonnenen Lymphozyten nach der Aufreinigung durch den Ficoll-Dichtegradienten zur Entfernung der Erythrozyten in der Zellkammer gezählt. Die ermittelten Zellzahlen aus den Experimenten mit 7-tägiger Erschöpfungsphase sind in der Tabelle in der **Abb. 13A** dargestellt. Im Durchflusszytometer wurde auch der relative Anteil der AND-transgenen T-Zellen ( $CD4^+/CD45.1^+$ ) an der gesamten Lymphozytenpopulation ermittelt, was in der **Abb. 13B** beispielhaft dargestellt ist. Die absolute Zahl der AND-T-Zellen in der Empfängermilz ergab sich aus dem Produkt der Lymphozytenzahl und dem relativen Anteil der AND-T-Zellen an den Lymphozyten. Darunter ist die statistische Auswertung der experimentellen Daten zu sehen. Links in der Abbildung sieht man den prozentualen Anteil der AND-T-Zellen unter den Lymphozyten, rechts im Bild die absoluten Zahlen. Wie man aus der Graphik erkennen kann, kommt es zu keiner Veränderung der relativen oder der absoluten T-Zellzahlen nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase.

In der **Abb. 13D** sind die Gesamtzahlen der Lymphozyten in den Empfängertieren nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase tabellarisch aufgelistet. In der **Abb. 13E** ist ein Beispiel für die Ermittlung der prozentualen Anteile der AND-T-Zellen unter den Lymphozyten zu sehen. In der **Abb. 13F** angeführt die Statistik über 3 unabhängige Experimente. Links im Bild ist die Graphik zu den relativen Anteilen der AND-T-Zelle an der Gesamtzahl der Lymphozyten zu finden. Erkennbar ist eine deutlich reduzierte Anzahl antigenspezifischer Zellen nach chronischer Stimulation mit der niedrigen, wie mit der hohen Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen. Also kommt es unter prolongierter Antigen-Exposition zu einer Reduktion der Population spezifischer T-Zellen, vermutlich durch Apoptose.



**Abb. 13. Ermittlung absoluter und relativer T-Zellzahlen pro Empfänger milz: Reduktion antigenspezifischer Zellen unter hoher und niedriger Antigen-Exposition nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase.**

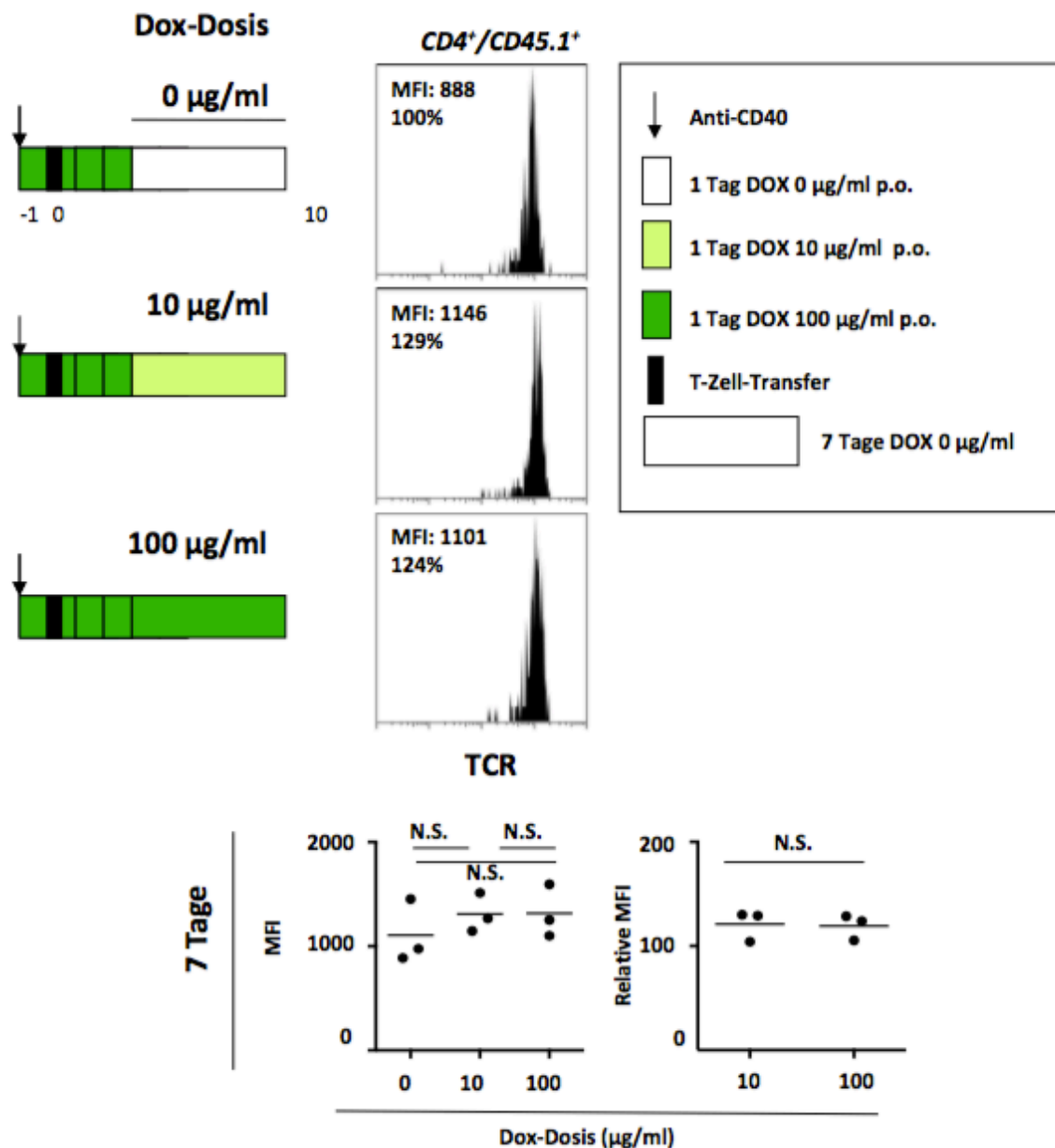
- In der Tabelle angeführt sind absolute T-Zell-Zahlen pro Empfänger milz nach 7-tägiger Erschöpfungsphase.
- Mittels FACS-Analyse wurden die relativen Zahlen der Spender-T-Zellen an den gesamten Milzzellen ermittelt.
- Links ist die statistische Auswertung von 9 unabhängigen Experimenten mit jeweils einem Versuchstier pro Bedingung zu sehen. Die Prozentzahlen der transferierten Zellen waren in allen Empfängern voneinander nicht signifikant (N.S.  $p \geq 0,05$ ) verschieden. Rechts ist die statistische Auswertung der absoluten Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Zellen zu sehen. Auch die absoluten Zellzahlen unterscheiden sich nicht signifikant (N.S.  $p \geq 0,05$ ).
- In der Tabelle angeführt sind absolute T-Zell-Zahlen pro Empfänger milz nach 28-tägiger Erschöpfungsphase.
- Mittels FACS-Analyse wurden die relativen Zahlen der Donor-T-Zellen an den gesamten Milzzellen ermittelt. Links unten die Statistik relativer Anteile von CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Zellen an den gesamten Zellzahl pro Milz. Die Prozentzahlen der transferierten Zellen unterschieden sich signifikant nach hoher und niedriger Antigen-Exposition im Vergleich zu den Gedächtniszellen (\* $p < 0,05$ ).
- Links ist die statistische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten zu sehen. Rechts ist die statistische Auswertung der absoluten Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>/CD45.1<sup>+</sup> Zellen gezeigt. Bereits nach niedriger Antigen-Exposition sind im Vergleich Gedächtniszellen weniger spezifische Zellen zu finden (\*\* $p < 0,005$ ). Auch eine hohen Antigenmenge in der Erschöpfungsphase führt zu einer signifikanten Reduktion absoluter Zellzahlen spezifischer Zellen (\* $p < 0,05$ ).

#### **4.11. Untersuchung der TCR-Expression auf der Oberfläche spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen**

Die oben beschriebenen Beobachtungen von der Erschöpfung Antigen-spezifischer T-Zellen warfen die Frage nach einem molekularem Mechanismus auf. Als eine mögliche Ursache für die ablaufenden Veränderungen im Phänotyp von AND T-Zellen unter chronischer Antigenexposition vermuteten wir eine reduzierte Expression des T-Zell-Rezeptors und somit eine verminderte Signaltransduktion in den spezifischen T-Zellen. Um dies zu überprüfen, färbten wir den T-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche spezifischer AND-transgener T-Zellen nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase mit unterschiedlicher Antigen-Exposition mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern und unterzogen sie einer durchflusszytometrischen Analyse. Um die Zellpopulationen miteinander vergleichen zu können wurde die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt.

Im oberen Teil der **Abb. 14** ist ein Beispiel dafür zu sehen. Im unteren Teil der **Abb.14** ist die statistische Auswertung der Daten aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Unterschiede in der TCR-Expression sind intraexperimentell nicht signifikant. Es besteht also kein Hinweis darauf, dass TCR auf den erschöpften Zellen herunterreguliert wird. Da die MFIs interexperimentell durch verschiedene Einstellung im Durchflusszytometer variabel waren, wurde die relative MFI im Verhältnis zu einer Kontrollfärbung ermittelt.

Dies ist konkordant mit den Daten über die CD8<sup>+</sup> T-Zell Erschöpfung aus der murinen Infektion mit LCMV Klon 13. Auch dort wurde keine Herunterregulation des TCR beobachtet (Wherry et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird der T-Zell-Rezeptor auf antigenspezifischen Zellen unter chronischer Antigenstimulation in Ii-MCC<sup>+</sup> Tieren, die das Antigen sowohl auf den DCs, als auch auf den B-Zellen präsentieren, herunterreguliert (Han et al., 2010). Somit scheinen entweder andere Moleküle außer der Antigenpräsentation durch die DCs ein Signal zur Herunterregulation der T-Zell-Rezeptoren zu geben oder die Antigenmenge pro Zelle ist in Ii-MCC<sup>+</sup> Tieren höher.



**Abb. 14. Untersuchung der TCR-Expression der T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigen-Dosis im Vergleich zu Gedächtniszellen.**

**Kein Unterschied in der TCR-Expression unter niedriger und hoher Antigen-Exposition im Vergleich zu Gedächtniszellen.**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 7 Tagen erhielten sie Doxycyclin in der angegebenen Konzentration. Der adoptive Transfer von Lymphknotenzellen TCR-transgener AND 45.1 bzw. 90.1 Mäusen erfolgte am Tag 0.

Am Tag 10 wurde die TCR-Expression auf der Oberfläche der Milzzellen durchflusszytometrisch untersucht und die MFI ermittelt.

Die Unterschiede in der TCR-Expression intraexperimentell waren nicht signifikant (N.S.  $p \geq 0,05$ ). Es besteht also kein Hinweis darauf, dass TCR der erschöpften Zellen vermindert exprimiert wird. Da sich aber MFIs interexperimentell sehr variabel sind, wurde die MFI-Ratio errechnet.

#### **4.12. Messung des phosphorylierten Transkriptionsfaktor Jun in antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Erschöpfungsphase unter hoher und niedriger Antigendosis im Vergleich zu Gedächtniszellen**

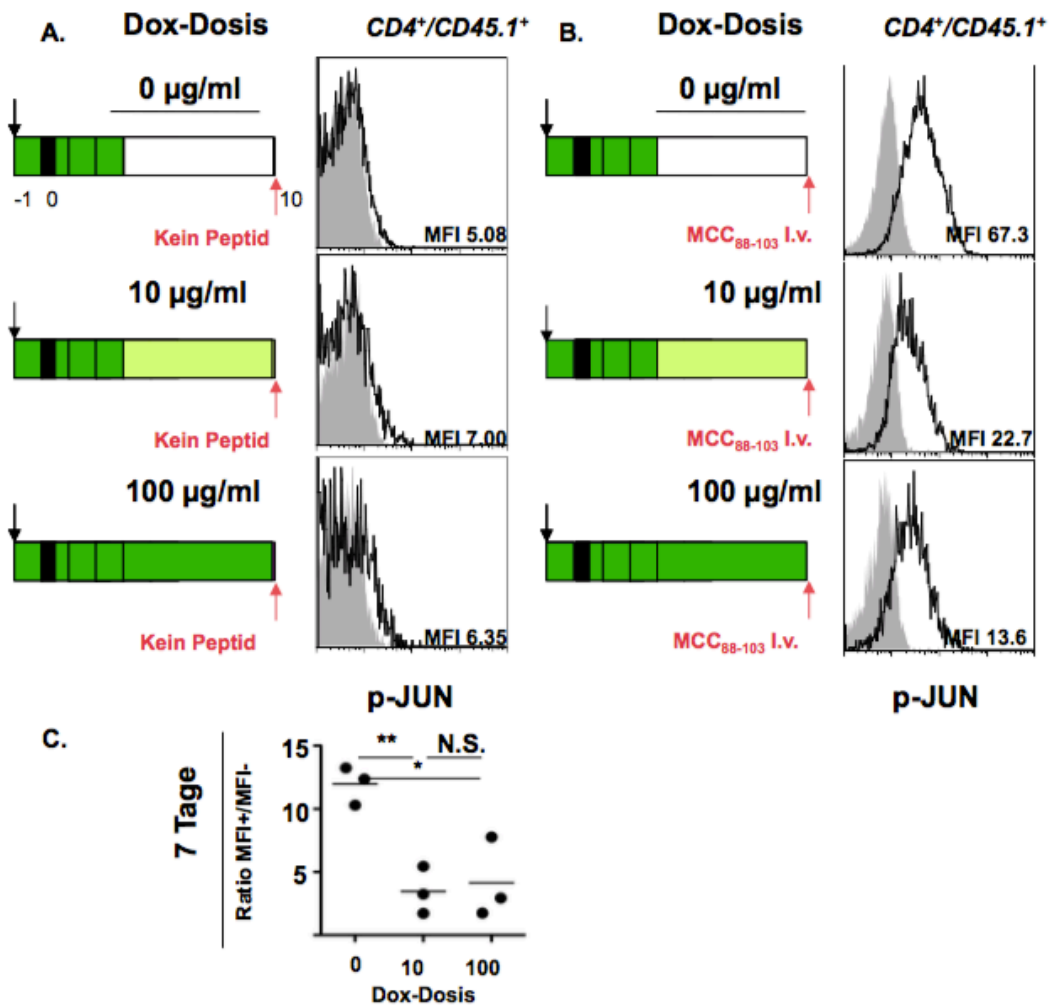
Da sich die TCR-Expression auf chronisch stimulierten AND-T-Zellen nicht wesentlich von dessen Expression auf Gedächtniszellen unterschied, beschlossen wir, Transkriptionsfaktoren in der TCR-Signalkaskade zu untersuchen. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass der Calcium-Einstrom in erschöpften T-Zellen unverändert funktional ist (Han et al., 2010). Interessant erschien uns deshalb die Ermittlung des Phosphorylierungsmusters in anderen Signaltransduktionswegen wie der NFκB- oder der MAPK-Kaskade. Da es zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente keine zuverlässige Methode zur Färbung des Transkriptionsfaktors NFκB und Bestimmung seiner Lokalisation zur Verfügung stand, beschlossen wir, die MAPK-Kaskade und das Phosphorylierungsmuster des Transkriptionsfaktors Jun zu untersuchen.

Dazu führten wir folgendes Experiment, in dem die Fähigkeit Antigen-spezifischer Zellen auf starke TCR-Signale zu reagieren überprüft werden sollte, durch: es wurden insgesamt 6 doppeltransgene Empfängertiere ausgewählt und über 4 Tage mit Trinkwasser mit Doxycyclin in Konzentration von 100µg/ml behandelt, während der weiteren 7 Tagen erhielten 2 Tiere kein Doxycyclin, 2 wurden mit einer Doxycyclin-Konzentration im Trinkwasser von 10 µg/ml und weitere 2 von 100 µg/ml behandelt. Der erste Tag des Experiment wurde als Tag -1 bezeichnet, am Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 2 Millionen Lymphknotenzellen aus TCR-transgenen AND45.1 Tieren. Am Analysetag, Tag 10, wurden eine Hälfte der Tiere mit 50 µl Peptid MCC<sub>88-103</sub> i.p. behandelt, um den antigenspezifischen Zellen ein erneutes starkes TCR-Signal zu geben, die andere Hälfte wurde zur Kontrolle mit 50µl PBS i.p. behandelt. Eine Stunde später wurden die Milzen der Empfängertiere entnommen und die intrazelluläre Färbung von phosphoryliertem Jun erfolgte.

In der **Abb. 15B** ist die durchflusszytometrische Analyse der Empfängermilzzellen 1 Stunde nach in vivo Stimulation mit 50 µl Peptid MCC<sub>88-103</sub> zu sehen, links daneben, in der **Abb. 15A** nicht stimulierte Kontrolle. Durch schwarze Linie dargestellt ist die p-Jun Färbung, grau hinterlegt die Isotyp-Kontrolle. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität für die p-Jun Färbung ermittelt, anschließend wurde ein Verhältnis zwischen den MFIs der mit Peptid behandelten und Tieren, die mit PBS behandelt wurden. In der **Abb. 15C** ist statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten zu finden.

Wie der **Abb. 15C** entnommen werden kann, kommt es während der Erschöpfungsphase zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Jun nach Peptidgabe sowohl unter hoher, als auch unter niedriger Antigendosis.

Da es zu einer Reduktion des pJun auch unter niedriger Antigen-Stimulation bereits nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase kommt, noch bevor phänotypische oder funktionelle Veränderungen erkennbar sind (vgl. Abb. 7-9), ist es naheliegend, dass eine Störung in der Signaltransduktion der MAPK-Kaskade dafür verantwortlich ist.



**Abb. 15. Intrazelluläre Färbung von phosphoryliertem Transkriptionsfaktor Jun nach 7-tägiger Erschöpfungsphase. Verminderte Phosphorylierung von Jun unter niedriger und hoher Ag-Exposition.**

Die doppelt-transgenen Empfängertiere erhielten über 4 Tage Trinkwasser mit Doxycyclin in der Konzentration von 100 µg/ml. Die Behandlung wurde am Tag -1 begonnen, zeitgleich wurden einmalig 50 µg eines anti-CD40 Antikörpers zur Aktivierung der DCs den Empfängern intraperitoneal injiziert (senkrechter Pfeil). In den darauffolgenden 7 Tagen erhielten sie Doxycyclin in den angegebenen Konzentrationen. Der adoptive Transfer TCR-transgener AND-T-Zellen erfolgte am Tag 0.

**A.** Nichtstimulierte Kontrolltiere. Durchflusszytometrische Analyse der Empfängermilzzellen 1 Stunde nach in vivo Behandlung mit 50 µl PBS i.p.

**B.** Durchflusszytometrische Analyse der Empfängermilzzellen 1 Stunde nach in vivo Stimulation mit 50 µl Peptid MCC<sub>88-103</sub> i.p.

**C.** Statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt symbolisiert ein Versuchstier. Verglichen wird das Verhältnis von p-Jun MFI in stimulierten zur p-Jun MFI der unstimulierten Tiere.

Signifikante Reduktion der p-Jun-Expression (schwarze Linie) sowohl unter hoher, als auch unter niedriger Antigen-Dosis (\*\*p < 0,005) im Vergleich zu Gedächtniszellen, grau hinterlegt ist die Isotyp- Kontrolle. Kein Nachweis von p-Jun unter der Behandlung mit PBS.

## 5. Diskussion

### 5.1. Infektionsmodell versus doppelt-transgenes Modell

Die Entwicklung der Subpopulation der sogenannten erschöpften antigenspezifischen T-Zellen ist typisch für chronische Infektionen und Tumorerkrankungen (Wherry et al., 2003; Wherry et al., 2007; Zehn and Wherry, 2015). Diese Subpopulation ist charakterisiert durch gestörte Effektorfunktionen, Hochregulation inhibitorischer Moleküle und ein verändertes Transkriptionsprogramm (Wherry et al., 2003; Wherry et al., 2007). Viele der Erkenntnisse über das adaptive Immunsystem, insbesondere über die virusspezifische T-Zell-Antwort und die Anzahl und Kinetik antigenspezifischer T-Zellen während einer viralen Infektion sowie das Phänomen der T-Zell-Erschöpfung wurden im murinen Infektionsmodell mit LCMV gewonnen (Zehn and Wherry, 2015).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss der Antigenpersistenz auf den Phänotyp antigenspezifischer Zellen im Rahmen einer chronischen Antigenpersistenz zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass die Antigenexposition allein für die Ausbildung einer sogenannten T-Zell-Erschöpfung ausreicht und zur Änderung der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie zur Beeinträchtigung ihrer Proliferation, der Produktion von Effektorzytokinen, wie TNF $\alpha$ , IL-2 und IFN $\gamma$ , und ihres Gesamtüberlebens führt. Dabei haben sowohl die Dauer der Antigenexposition, als auch die Höhe der Antigenlast einen Einfluss auf den Schweregrad der Erschöpfung. Diese Fragestellungen konnten wir mithilfe des uns zur Verfügung stehenden doppelt-transgenen Mausmodells (Ii-rTA-TIM), in dem unter Behandlung mit Doxycyclin ein Antigen auf dendritischen Zellen präsentiert und somit durch gezieltes Zuführen und Absetzen von Doxycyclin im Trinkwasser die Präsentation eines Modellantigens auf dendritischen Zellen *in vivo* gesteuert werden kann, beantworten. Das Phänomen der T-Zell-Erschöpfung wurde in Vergangenheit bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, allerdings handelte es sich bei den erwähnten Arbeiten vorwiegend um Untersuchungen in Infektionsmodellen, größtenteils Infektionsmodellen mit LCMV, einem Virus, welches im Wirt oft zu Lymphopenie und Immunsuppression (Althage et al., 1992; Ejrnaes et al., 2006) sowie gesteigertem Umsatz von dendritischen Zellen (Oldstone, 2006) und systemischen Entzündungsreaktionen führt. Deshalb blieb es auf der einen Seite oft unklar, welche Veränderungen der spezifischen T-Zellen in chronischen Infektionen durch die Antigenpersistenz und welche durch den Krankheitsverlauf und Entzündung, Pathogenität und Lokalisation des Erregers oder die Interaktion zwischen den Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems bedingt sind. Zudem sind im LCMV-Modell Antigenpersistenz und T-Zell-



Erschöpfung zwei voneinander abhängige Variablen, so dass Änderung eines Parameters zwingend den zweiten Parameter beeinflusst (Frebel et al., 2010). Nur eine Infektion mit einer hohen Virendosis erlaubt es, das Immunsystem zu „überwältigen“ und eine chronische Infektion herbeizuführen. So kann beispielsweise in einer LCMV-Infektion ein erhöhter IFN $\gamma$ -Spiegel zu einer Veränderung der parenchymalen Expression von MHC-Molekülen und Aktivierung hämatopoetischer Stammzellen führen (Baldridge et al., 2010), was Störfaktoren bei Interpretation der Ergebnisse darstellen kann. In dem uns zur Verfügung stehenden doppelt-transgenen Mausmodell hingegen wird das Antigen während einer Behandlung mit Doxycyclin auf der Oberfläche der dendritischen Zellen präsentiert. Nach dem Beenden der Behandlung mit dem Pharmakon wird der Peptid-MHC-Komplex innerhalb kurzer Zeit umgesetzt (Obst et al., 2005), sodass die Dauer der Antigenpräsentation genau kontrolliert werden kann. Da das Antigen von dendritischen Zellen exprimiert und ausschließlich von den zuvor adoptiv transferierten TCR-transgenen AND CD4<sup>+</sup> Zellen erkannt wird, werden eine gleichzeitige B-Zell- und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort, sowie eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems vermieden. Durch kontrollierte Verabreichung von Doxycyclin wird eine konstante und reproduzierbare Antigenpräsentation erreicht. Dies wird in einem Infektionsmodell durch die Immunantwort selbst beeinflusst.

## **5.2. Einfluss der Antigendosis auf die T-Zell Erschöpfung**

Durch die Behandlung der Mäuse mit unterschiedlich hohen Doxycyclindosen haben wir in dieser Arbeit Zusammenhänge zwischen der Antigendosis und dem Grad der Erschöpfung untersucht. Der Schweregrad der Erschöpfung wurde in den hier beschriebenen Experimenten an den Proliferationsfähigkeit der Zellen, Expression von Gedächtniszellmarkern auf der Zelloberfläche und ihre Fähigkeit, Zytokine wie IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zu bilden, gemessen. Diese Parameter sind in einer chronischen Infektion beeinträchtigt (Fuller and Zajac, 2003; Zajac et al., 1998). In den Versuchen, die in diese Arbeit eingegangen sind, wurden die Zellen in der Primingphase der gleichen Antigendosis ausgesetzt und somit gleichmäßig aktiviert. Dies sorgt für eine gute Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Populationen, sowie für eine genauere Untersuchung der Auswirkung der Antigendosis in der Erschöpfungsphase. Die oben genannten Oberflächenmarker und funktionellen Bestimmungsgrößen werden in naiven Zellen, Gedächtniszellen, Zellen, die mit einer niedrigen und solchen, die mit einer hohen Antigenlast während der Erschöpfungsphase konfrontiert waren, gemessen und verglichen. Hohe Antigendosis wurde bei Etablierung des doppe-transgenen Modells definiert (Obst et al., 2005). Die „geringe“ Antigendosis wurde in

Vorversuchen ermittelt und entsprach in unserem Modell der niedrigsten Doxycyclindosis, die reproduzierbar zu Zellproliferation führte.

Arbeitsgruppen, die in Infektionsmodellen arbeiten versuchten die Fragestellung zu beantworten, indem sie Versuchstiere mit unterschiedlichen Stämmen eines Virus (LCMV Armstrong oder Klon 13) sowie unterschiedlichen Virusmengen infizieren (Matloubian et al., 1990; McKay et al., 2002; Zajac et al., 1998), ob der Schweregrad der Virämie immer mit den injizierten Virusmengen korreliert bleibt offen. Alternativ wird versucht, unterschiedlich hohe Antigenlast zu erreichen, indem die Darreichungsformen der Viren variiert wird, hohe Antigenlast wird bei intravenöser Injektion, niedrige bei intranasaler oder intraperitonealer Gabe angenommen (Zajac et al., 1998). Dabei stellt sich die Frage nach der Vergleichbarkeit zwischen beispielsweise direkter intravenöser und intraperitonealer Applikation.

### **5.3. Einfluss der Dauer der Antigenpräsenttion auf die T-Zell-Erschöpfung**

Im Rahmen der Experimente zu dieser Doktorarbeit wurde auch der Einfluss des zeitlichen Faktors auf die Ausbildung des erschöpften Phänotyps in  $CD4^+$  Zellen unter chronischer Antigenstimulation geprüft. Die Zellen wurden zu 2 Analysezeitpunkten untersucht: der erste Analysezeitpunkt fand nach einer 7-tägigen, der zweite nach einer 28-tägigen Erschöpfungsphase statt. Der erste Zeitpunkt wurde gewählt, weil sich Effektorzellen nach etwa 4-10 Tagen voll entwickeln, den höchsten Wert virusspezifischer Zellen in der Milz nach der Infektion findet man am Tag 10 post infectionem, danach fällt ihre Anzahl ab, bis sie am Tag 30 ein Plateau erreicht (Zelinskyy et al., 2006). Da der Funktionsverlust antigenspezifischer T-Zellen im Infektionsmodell etwa am Tag 14 post infectionem beginnt (Zelinskyy et al., 2006), haben wir erwartet das die Erschöpfung am Tag 28 post infectionem bereits fortgeschritten ist.

In den hier vorgestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dauer der Antigenpräsentation als auch die Antigenmenge für die Ausbildung eines erschöpften Phänotyps eine entscheidende Rolle spielen. Dabei führt eine hohe Antigenexposition früher zu Ausbildung eines erschöpften Phänotyps als eine niedrige Antigenexposition. Unter hoher Antigenexposition kam es bereits nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase zur Ausbildung eines erschöpften Phänotyps. Es wurde die Herunterregulation des Gedächtniszellmarker Ly6C und einer vermehrten Expression von CD62L, als Marker von naiven Zellen, auf den antigenspezifischen  $CD4^+$  Zellen festgestellt. Die erschöpften Zellen proliferierten signifikant weniger als Gedächtniszellen oder Zellen mit niedriger Antigenexposition und sezernierten deutlich weniger IL-2 und TNF $\alpha$ . Die Fähigkeit INF $\gamma$  zu produzieren blieb dabei nach einer 7-tägigen Erschöpfungsphase wenig beeinträchtigt. Eine Reduktion der IFN $\gamma$ -Produktion zeigte sich selbst unter hoher Antigenstimulation erst zu

einem späteren Zeitpunkt. Somit verhalten sich unterschiedliche Funktionsparameter unter gleicher Antigenexposition und Expositionsdauer unterschiedlich. Insbesondere fiel unter hoher Antigen-Stimulation eine Verminderung der IL-2- und TNF $\alpha$ -Sekretion auf, während die IFN $\gamma$ -Produktion noch normwertig blieb. Dieser Unterschied könnte durch unterschiedliche Regulation auf der Transkriptionsebene bedingt sein. Insbesondere ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NFAT-1 für die Transkription von der IL-2- und TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Genen kontrolliert (Kiani et al., 2001; Rao et al., 1997), allerdings wird die IFN $\gamma$ -Sekretion zusätzlich durch die STAT4-IL12/NF $\kappa$ B Signalkaskade reguliert (Kiani et al., 2001). So ist beispielsweise die IFN $\gamma$ -Sekretion in NFAT<sup>-/-</sup>/IL-4<sup>-/-</sup> T-Helferzellen nicht reduziert (Kiani et al., 2001).

Auch Wherry and al. beobachteten in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im LCMV Infektionsmodell eine frühere Reduktion von IL-2- oder TNF $\alpha$ -Produktion im Vergleich zur IFN $\gamma$ -Produktion (Wherry et al., 2003). Dies wurde mit der Wichtigkeit der Induktion einer peripheren Toleranz während chronischer Infektionen in Zusammenhang gebracht. Möglicherweise sind die Folgen einer überschießenden Immunantwort gefürchteter, als die Infektion selbst, denn IL-2- und TNF $\alpha$ -Überproduktion haben verheerende Auswirkungen auf den Organismus (Guidotti and Chisari, 2000).

In weiterführenden Experimenten wäre es interessant zu erfahren, wie der Phänotyp der erschöpften Zellen nach hoher und niedriger Antigenexposition zu einem späteren Zeitpunkt aussieht, ob Zellen mit niedriger Antigenexposition den gleichen Grad der Erschöpfung erlangen wie Zellen mit hoher Antigenexposition oder ob diese zu einem späteren Zeitpunkt an das Antigen adaptieren und ihre Effektorfunktionen zurückgewinnen. Es wäre weiterhin interessant zu wissen, ob sich die Zellen nach einer Ruhephase erholen und wie lang diese Ruhephase sein soll, ob sich Zellen mit niedriger Antigenexposition schneller erholen als solche mit hoher Antigenexposition.

#### **5.4. Mechanismen der T-Zell Erschöpfung**

In dieser Arbeit haben wir versucht, mögliche Mechanismen der T-Zell-Erschöpfung zu identifizieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es zu keiner Veränderung der TCR-Expression auf der Zelloberfläche erschöpfter T-Zellen kommt (Han et al., 2010). Somit war unsere Vermutung, dass der verantwortliche Mechanismus weiter unten in der TCR-Signalkaskade liegen muss. Ein Doktorand unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass es zu keiner Veränderung des Calciumstroms unter chronischer Antigenstimulation kommt (Han et al., 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Agnellini et al. im LCMV-Modell (Agnellini et al., 2007). Erstaunlicherweise wird in einem anderen transgene Mausmodell, der E $\alpha$ MCC-Mauslinie, in der das Antigen MCC

außer von DCs auch von naiven B-Zellen präsentiert wird, das TCR in chronisch stimulierten CD4<sup>+</sup> Zellen herunterreguliert und der Calciumstrom vermindert (Han et al., 2010).

Dies deutet auf eine Fähigkeit der CD4<sup>+</sup> Zellen zu unterscheiden, ob das Antigen von einer dendritischen Zellen oder einer B-Zelle präsentiert wird. In der Literatur wurde eine numerische Reduktion Antigen-spezifischer Zellen in chronischen Infektionen beschrieben. Diese war auch in unserem Modell nach einer längeren Erschöpfungsphase zu verzeichnen. Die von uns gemachten Beobachtungen sind gut vereinbar mit Daten aus der Literatur, wo ein hierarchischer Funktionsverlust erschöpfter Zellen beschrieben wird (Wherry et al., 2003).

De Silva et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass ein TCR-Signal in nicht proliferierenden Zellen zu Anergie, bzw. Unfähigkeit IL-2 zu sezernieren führt (DeSilva et al., 1991). Dies wurde als Folge einer Anreicherung von Proteinen im Zusammenhang mit TCR-Stimulation und mangelnder Verdünnung der Substanz bei fehlender Teilung diskutiert. Möglicherweise liegt ein ähnlicher Mechanismus der Dysfunktion antigenspezifischer Zellen in chronischen Infektionen zugrunde, angesichts der Tatsache, dass Zellen mit hoher Antigenlast sich seltener teilen als Zellen mit niedriger Antigenlast und gleichzeitig weniger Zytokine produzieren (Siehe Abb. 7 und 8), erscheint dies durchaus plausibel.

Da eine etwa 3-tägige Antigenpräsentation für eine effektive T-Zell-Aktivierung benötigt wird, liegt der Verdacht nahe dass ein stimulatorisches Signal zwischen Tag 3 und Tag 10 der Antigenpersistenz in ein inhibitorisches umgewandelt wird.

## **5.5. Rolle der MAPK-Signalkaskade in der T-Zell-Erschöpfung**

Mitogen-Activated protein kinases (MAPKs) sind Serin/Threonin-Kinasen die an der intrazellulärer Signaltransduktion multipler Vorgänge, wie Zellteilung, -differenzierung und – überleben beteiligt sind (Dhillon et al., 2007; McCubrey et al., 2006; Torii et al., 2006). Zu den MAP-Kinasen gehören die Kinasen ERK, p38 und c-Jun, welche durch die Phosphorylierung durch MAP2-Kinasen MEK, MKK3/MKK6 und MKK4/MKK7 aktiviert werden (Kim and Choi, 2010). Diese wiederum werden durch MAP3-Kinasen Raf sowie ASK1, MEKK1 und MLK3 phosphoryliert und aktiviert (Kim and Choi, 2010). Die Signalkaskaden werden unter Anderem durch oxidativen, osmotischen, hypoxischen oder toxischen Stress ausgelöst (McCubrey et al., 2006). Als Folge dieser Signaltransduktionen können neurodegenerative oder neoplastische Erkrankungen entstehen (Kim and Choi, 2010; Torii et al., 2006).

Noch ist unklar, welche Rolle die MAPK-Signalkaskade bei der Entstehung der T-Zell-Erschöpfung spielt. Da der MAPK-Signaltransduktionsweg die wichtigste Signalkaskade abwärts des T-Zell-Rezeptors darstellt (Gupta et al., 1994; Weiss and Littman, 1994) und die T-Zell-

Erschöpfung eine Folge der chronischen Stimulation des T-Zell-Rezeptors ist (Barber et al., 2006), könnte zum einen eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs die Ursache der phänotypischen Veränderungen der erschöpften T-Zellen sein, zum anderen eine Blockade der Signalkaskade zur Reaktivierung der erschöpften T-Zellen in chronischen Infektionen wie in Tumorerkrankungen führen. So konnten beispielsweise Ebert et al. im Mausmodell zeigen, dass die Blockade der MAP2-Kinase MEK in Ras-mutiertem Colonicarcinom nicht nur zum Regress der Tumorgroße, sondern auch zur Zunahme der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Effektorzellen führt (Ebert et al., 2016). Ausserdem führte die MEK-Blockade nicht nur zu einer numerischen, sondern auch zu einer qualitativen Änderung der tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen: diese präsentierten deutlich seltener inhibitorische Moleküle wie PD-1, exprimierten sowohl Tbet als auch Eomes, produzierten IFN $\gamma$  und gingen seltener durch Apoptose unter (Ebert et al., 2016). Da aber die MAPK-Kaskade auch für Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen entscheidend ist (Ebert et al., 2016), ist der Gebrauch von MEK-Inhibitoren kritisch zu hinterfragen.

In dieser Doktorarbeit haben wir einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der Herunterregulation von phosphoryliertem Faktor c-Jun, als eine der drei Achsen der MAPK-Signalkaskade, und der T-Zell-Erschöpfung aufgezeigt. Inaktivierung von Kinasen in der MAPK-Kaskade wurde in Vergangenheit bereits mit Anergiezustand von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen in Verbindung gebracht (Fields et al., 1996; Li et al., 1996). Als Ausblick wäre es interessant, die ERK- und p38-Achse und deren Zusammenhang mit den einzelnen phänotypischen Veränderungen, insbesondere auch mit der von uns beobachteten langsamen klonalen Deletion antigenspezifischer Zellen (Siehe Abb. 12) zu untersuchen. Ebert et al. konnten im Tumormodell durch MEK-Inhibition eine klonale Deletion der Antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen durch Herunterregulation des proapoptotischen Moleküls Nur77 verhindern (Ebert et al., 2016). Können wir in unserem Modell den Untergang antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> durch MEK-Inhibition aufhalten? Wie verhält sich p-Jun im weiteren zeitlichen Verlauf? Wie ist die Konzentration von NFAT-1 in erschöpften Zellen im Vergleich zu naiven Zellen und Gedächtniszellen? Weisen erschöpfte Zellen Veränderungen auf den epigenetischen oder genetischen Ebenen auf? In dieser Hinsicht wäre es wichtig die im Rahmen dieser Arbeit gewonnene mRNA erschöpfter Zellen, zu analysieren.

## **5.6. Chronische Antigenstimulation und Expression inhibitorischer Moleküle**

In der Literatur wird T-Zell-Erschöpfung oft mit Expression von inhibitorischen Molekülen, wie PD-1, LAG-3, Tim-3, CTLA-4, 2B4 oder CD160 in Verbindung gebracht (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009). Wir konnten entgegen einer lang bestehenden Hypothese zeigen, dass es

keinen notwendigen Zusammenhang zwischen PD-1 Expression und T-Zell-Erschöpfung gibt und dass sich ein erschöpfter Phänotyp auch ohne PD-1-Expression einstellen kann. Zu diesem Schluss kamen auch Odorizzi et al. im LCMV-Infektionsmodell (Odorizzi et al., 2015). Wir konnten auch zeigen, dass die Antigenpersistenz allein keine vermehrte Expression von PD-1 oder anderen inhibitorischen Molekülen induziert (Han et al., 2010). Dies spricht dafür, dass möglicherweise andere Faktoren in Kombination mit chronischer Antigenpersistenz zur PD-1 Expression führen. Interessanterweise exprimieren die TCR-transgene AND CD4<sup>+</sup> Zellen nach chronischer Antigenexposition in Ii-MCC Mäusen, in den denen das Antigen nicht nur durch dendritische Zellen, sondern auch durch B-Zellen präsentiert wird, vermehrt PD-1 auf ihrer Oberfläche (Han et al., 2010).

Seitdem die Rolle der inhibitorischen Moleküle, wie PD-1 und CTLA-4, beschrieben wurde ist etwas mehr als ein Jahrzehnt vergangen, mittlerweile wissen wir, dass das PD-1 Signal vor einer überschießenden Reaktion und Proliferation der zytotoxischen T-Zellen und im Endeffekt vor Gewebsdestruktion schützt (Odorizzi et al., 2015). Seit mehreren Jahren werden Antikörper gegen CTLA-4 und PD-1 erfolgreich in der Therapie von unterschiedlichen malignen Erkrankungen angewandt und führen zur Reaktivierung antigenspezifischer tumorinfiltrierender Lymphozyten (Mellman et al., 2011; Pauken and Wherry, 2015; Sharma et al., 2011; Zarour, 2016). Die Erforschung der T-Zell-Erschöpfung hat sich als ein hochspannendes und zukunftsweisendes Feld erwiesen. Auch in dieser Perspektive werden die Untersuchungen dieses Phänomens neue Erkenntnisse über Infektions- und Tumorummunologie bringen und zu neuen therapeutischen Lösungen bei chronischen Infektionen und Neoplasien führen.

## 6. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass einige chronisch persistierende Infektionen, wie LCMV der Maus oder HIV, HBV, HCV im Menschen, mit einer funktionellen Beeinträchtigung virusspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verbunden sind, welche in der Literatur als T-Zell-Erschöpfung bezeichnet wird. Akute virale Erkrankungen dagegen, wie die EBV- oder CMV-Infektion im Menschen oder die MCMV-Infektion der Maus, führen zu keiner Erschöpfung spezifischer T-Zellen. In dem uns zur Verfügung stehenden doppelt-transgenen Mausmodell (Ii-rTA-TIM) wird während der Behandlung mit Doxycyclin ein Antigen auf dendritischen Zellen präsentiert; somit kann durch gezieltes Zuführen und Absetzen von Doxycyclin im Trinkwasser die Präsentation eines Modellantigens auf dendritischen Zellen in vivo gesteuert werden. In dieser Doktorarbeit zeigen wir, dass die Antigenpersistenz über die Primingphase hinaus für das Auftreten eines erschöpften Phänotyps der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich ist. Durch Stimulation ausschließlich der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte ihr Phänotyp und Verhalten Pathogen-unabhängig und unter Ausschaltung komplizierender Faktoren, wie der systemischen Inflammation, untersucht werden. Unser Modell erlaubte uns, durch die Variation der Doxycyclin-Dosis im Trinkwasser eine variable Menge des Antigens, welches auf dendritischen Zellen präsentiert wird, zu erreichen. Somit konnten wir zum einen zeigen, dass allein die Antigenpersistenz zur Entwicklung eines erschöpften Phänotyps, d.h. Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern, Reduktion der Proliferation und der Sekretion von Effektorzytokinen, ausreicht. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der Grad der Erschöpfung von der Antigendosis und Dauer der Antigenpersistenz abhängt. Des Weiteren konnte ein möglicher verantwortlicher molekularer Mechanismus für die Ausbildung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Erschöpfung nachgewiesen werden.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AG	Aktiengesellschaft
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
al.	Alii
ALX647	Alexa Fluor 647 dye
AP1	Activator Protein-1
APC	antigen presenting cells
BATF	activating transcription factor B
BCL6	B-cell leukemia/lymphoma 6
BD	Beckton Dickson
Berg.-Gladbach	Bergisch Gladbach
Bim	Bcl-2-like protein 11
Blimp-1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
bzw.	Beziehungsweise
Cbl-b	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	cluster of differentiation
CFDA-SE	5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalievirus
CO <sup>2</sup>	Kohlendioxid
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
d.b.	das bedeutet
d.h.	das heißt
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1
DCs	dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
EBV	Ebstein-Baar-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FSC	Vorwärtsstreulicht



Fyn	fibroblast yes-related non-receptor kinase
G	Gramm
G-Protein	GTPase activating protein
GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GP 49	Glycoprotein 49
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes simplex Virus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	invariante Kette
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosin based activation motif
KLF4	Krueppel-like factor 4
LAG3	Lymphocyte activation gene 3 protein
Lck	lymphocyte kinase
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
LFA1	lymphocyte function associated antigen 1
LICOS	inducible T-cell co-stimulator ligand
Lilbr4	leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LO	links oben
LPS	Lipopolysaccharide
LU	links unten
M	Mol
MAP	mitogen activated protein
MCC	moth cytochrom C
MCMV	Murine cytomegalovirus
MEM NEAA	MEM Non-essential Amino Acid Solution
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFkappaB	nuclear factor-kappaB

ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
p.o.	per os
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PD1	Programmed cell death 1
PD1-L	Programmed cell death 1 ligand
PE	Phycoerythrin
PE/Cy5.5	Phycoerythrin/Cyanine 5 monosuccinimidyl ester
PERM	Permeabilisation
PFU	plaque forming units
pH	pondus Hydrogenii
PRDM1	Positive regulatory domain I-binding factor 1
RNA	ribonucleic acid
RO	rechts oben
rpm	rotations per minute
rTA	reversed Transactivator
RU	rechts unten
SDS	sodium lauryl sulfate
SH2	Src-homology 2
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEA	Triethylamin
Tg	Transgen
TGF	transforming grow factor
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM	Tetracyclin induzierbare invariante Kette mit Mottecytochrom C
TNF	Tumorerkrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	United States of America
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Association
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Agnellini, P., Wolint, P., Rehr, M., Cahenzli, J., Karrer, U., and Oxenius, A. (2007). Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell functions during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4565-4570.

Ahmed, R., Byrne, J.A., and Oldstone, M.B. (1984). Virus specificity of cytotoxic T lymphocytes generated during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection: role of the H-2 region in determining cross-reactivity for different lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J. Virol.* 51, 34-41.

Althage, A., Odermatt, B., Moskophidis, D., Kundig, T., Hoffman-Rohrer, U., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1992). Immunosuppression by lymphocytic choriomeningitis virus infection: competent effector T and B cells but impaired antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 22, 1803-1812.

Angelosanto, J.M., Blackburn, S.D., Crawford, A., and Wherry, E.J. (2012). Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J. Virol.* 86, 8161-8170.

Aubert, R.D., Kamphorst, A.O., Sarkar, S., Vezys, V., Ha, S.J., Barber, D.L., Ye, L., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2011). Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 21182-21187.

Baldrige, M.T., King, K.Y., Boles, N.C., Weksberg, D.C., and Goodell, M.A. (2010). Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature.* 465, 793-797.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 439, 682-687.

- Belz, G.T., Xie, W., Altman, J.D., and Doherty, P.C. (2000). A previously unrecognized H-2D<sup>b</sup>-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *J. Virol.* *74*, 3486-3493.
- Bertoletti, A., and Maini, M.K. (2000). Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 387-392.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., *et al.* (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* *107*, 4781-4789.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* *10*, 29-37.
- Blattman, J.N., Wherry, E.J., Ha, S.J., van der Most, R.G., and Ahmed, R. (2009). Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection. *J. Virol.* *83*, 4386-4394.
- Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., *et al.* (2007). Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* *81*, 4215-4225.
- Bowen, D.G., and Walker, C.M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* *436*, 946-952.
- Bredley, L.M., and Watson, S.R. (1996). Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 312-320.
- Brooks, D.G., Teyton, L., Oldstone, M.B., and McGavern, D.B. (2005). Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J. Virol.* *79*, 10514-10527.
- Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* *12*, 1301-1309.

- Bucks, C.M., Norton, J.A., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., and Katsikis, P.D. (2009). Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *J. Immunol.* *182*, 6697-6708.
- Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 336-341.
- Carneiro-Sampaio, M., and Coutinho, A. (2007). Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. *Adv. Immunol.* *95*, 51-82.
- Crawford, A., Angelosanto, J.M., Kao, C., Doering, T.A., Odorizzi, P.M., Barnett, B.E., and Wherry, E.J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* *40*, 289-302.
- Crawford, A., and Wherry, E.J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 179-186.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621-663.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 333-340.
- Das, A., Hoare, M., Davies, N., Lopes, A.R., Dunn, C., Kennedy, P.T., Alexander, G., Finney, H., Lawson, A., Plunkett, F.J., *et al.* (2008). Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* *205*, 2111-2124.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by  $\alpha\beta$  T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 523-544.
- DeSilva, D.R., Urdahl, K.B., and Jenkins, M.K. (1991). Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J. Immunol.* *147*, 3261-3267.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* *26*, 3279-3290.
- Ebert, P.J.R., Cheung, J., Yang, Y., McNamara, E., Hong, R., Moskalenko, M., Gould, S.E., Maecker, H., Irving, B.A., Kim, J.M., *et al.* (2016). MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity* *44*, 609-621.

- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., *et al.* (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
- Ejrnaes, M., Filippi, C.M., Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, S., and von Herrath, M.G. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2461-2472.
- Elsaesser, H., Sauer, K., and Brooks, D.G. (2009). IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324, 1569-1572.
- Engelbrechtsen, K.A., and Thyssen, J.P. (2016). Skin Barrier Function and Allergens. *Curr. Probl. Dermatol.* 49, 90-102.
- Fahey, L.M., Wilson, E.B., Elsaesser, H., Fistonich, C.D., McGavern, D.B., and Brooks, D.G. (2011). Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 208, 987-999.
- Fields, P.E., Gajewski, T.F., and Fitch, F.W. (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 271, 1276-1278.
- Fourcade, J., Kudela, P., Sun, Z., Shen, H., Land, S.R., Lenzner, D., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Ferrone, S., *et al.* (2009). PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell expansion in melanoma patients. *J. Immunol.* 182, 5240-5249.
- Frebel, H., Richter, K., and Oxenius, A. (2010). How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 40, 654-663.
- Fu, Z., and Cannon, M.J. (2000). Functional analysis of the CD4<sup>+</sup> T-cell response to Epstein-Barr virus: T-cell-mediated activation of resting B cells and induction of viral BZLF1 expression. *J. Virol.* 74, 6675-6679.
- Fuller, M.J., Khanolkar, A., Tebo, A.E., and Zajac, A.J. (2004). Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J. Immunol.* 172, 4204-4214.
- Fuller, M.J., and Zajac, A.J. (2003). Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J. Immunol.* 170, 477-486.

- Ganeshan, K., and Chawla, A. (2014). Metabolic regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 609-634.
- Gaucher, D., Therrien, R., Kettaf, N., Angermann, B.R., Boucher, G., Filali-Mouhim, A., Moser, J.M., Mehta, R.S., Drake, D.R., 3rd, Castro, E., *et al.* (2008). Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med.* 205, 3119-3131.
- Gautam, S., Kumar, R., Singh, N., Singh, A.K., Rai, M., Sacks, D., Sundar, S., and Nylen, S. (2014). CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 209, 290-299.
- Ge, Q., Hu, H., Eisen, H.N., and Chen, J. (2002). Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2989-2994.
- Goepfert, P.A., Bansal, A., Edwards, B.H., Ritter, G.D., Jr., Tellez, I., McPherson, S.A., Sabbaj, S., and Mulligan, M.J. (2000). A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J. Virol.* 74, 10249-10255.
- Grayson, J.M., Weant, A.E., Holbrook, B.C., and Hildeman, D. (2006). Role of Bim in regulating CD8<sup>+</sup> T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* 80, 8627-8638.
- Gruener, N.H., Lechner, F., Jung, M.C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., Walker, B., Sullivan, J., Phillips, R., Pape, G.R., *et al.* (2001). Sustained dysfunction of antiviral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J. Virol.* 75, 5550-5558.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2000). Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 273, 221-227.
- Gupta, S., Weiss, A., Kumar, G., Wang, S., and Nel, A. (1994). The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. Evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant. *J. Biol. Chem.* 269, 17349-17357.
- Hadrup, S.R., Strindhall, J., Kollgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., thor Straten, P., and Wikby, A. (2006). Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J. Immunol.* 176, 2645-2653.

- Han, S., Asoyan, A., Rabenstein, H., Nakano, N., and Obst, R. (2010). Role of antigen persistence and dose for CD4<sup>+</sup> T-cell exhaustion and recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 20453-20458.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* *194*, 769-779.
- Henrickson, S.E., Mempel, T.R., Mazo, I.B., Liu, B., Artyomov, M.N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M.P., Senman, B., Junt, T., *et al.* (2008). T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat. Immunol.* *9*, 282-291.
- Homann, D., Teyton, L., and Oldstone, M.B. (2001). Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8<sup>+</sup> but declining CD4<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat. Med.* *7*, 913-919.
- Horiuchi, Y., Takagi, A., Kobayashi, N., Moriya, O., Nagai, T., Moriya, K., Tsutsumi, T., Koike, K., and Akatsuka, T. (2014). Effect of the infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells. *Hepatol. Res.* *44*, E240-E252.
- Jadidi-Niaragh, F., and Mirshafiey, A. (2011). Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* *74*, 1-13.
- Jameson, S.C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* *31*, 859-871.
- Jamieson, B.D., Yang, O.O., Hultin, L., Hausner, M.A., Hultin, P., Matud, J., Kunstman, K., Killian, S., Altman, J., Kommander, K., *et al.* (2003). Epitope escape mutation and decay of human immunodeficiency virus type 1-specific CTL responses. *J. Immunol.* *171*, 5372-5379.
- Janeway, C.A., Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J., and Bottomly, K. (1988). CD4<sup>+</sup> T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* *101*, 39-80.
- Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safritz, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., *et al.* (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8<sup>+</sup> T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* *189*, 991-998.



- Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., and Koszinowski, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Virol.* *64*, 5457-5464.
- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* *111*, 837-851.
- Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., *et al.* (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat. Immunol.* *12*, 663-671.
- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R., and Hedrick, S.M. (1989). Selective development of CD4<sup>+</sup> T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature.* *341*, 746-749.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and Immunity *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 677-704.
- Kiani, A., Garcia-Cozar, F.J., Habermann, I., Laforsch, S., Aebischer, T., Ehninger, G., and Rao, A. (2001). Regulation of interferon- $\gamma$  gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* *98*, 1480-1488.
- Kim, E.K., and Choi, E.J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* *1802*, 396-405.
- Komanduri, K.V., Viswanathan, M.N., Wieder, E.D., Schmidt, D.K., Bredt, B.M., Jacobson, M.A., and McCune, J.M. (1998). Restoration of cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat. Med.* *4*, 953-956.
- Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D., and Bradley, L.M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J. Exp. Med.* *198*, 1797-1806.
- Kostense, S., Ogg, G.S., Manting, E.H., Gillespie, G., Joling, J., Vandenberghe, K., Veenhof, E.Z., van Baarle, D., Jurriaans, S., Klein, M.R., *et al.* (2001). High viral burden in the presence of

major HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur. J. Immunol.* *31*, 677-686.

Kostense, S., Vandenberghe, K., Joling, J., Van Baarle, D., Nanlohy, N., Manting, E., and Miedema, F. (2002). Persistent numbers of tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, but loss of interferon- $\gamma$ <sup>+</sup> HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* *99*, 2505-2511.

Lai, J.H., Horvath, G., Subleski, J., Bruder, J., Ghosh, P., and Tan, T.H. (1995). RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4260-4271.

Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* *191*, 1499-1512.

Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D., *et al.* (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* *5*, 677-685.

Li, Q., Skinner, P.J., Ha, S.J., Duan, L., Mattila, T.L., Hage, A., White, C., Barber, D.L., O'Mara, L., Southern, P.J., *et al.* (2009). Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science* *323*, 1726-1729.

Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A., and Mueller, D.L. (1996). Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* *271*, 1272-1276.

Lindstein, T., June, C.H., Ledbetter, J.A., Stella, G., and Thompson, C.B. (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* *244*, 339-343.

Lohning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H.W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E., and Kroczeck, R.A. (2003). Expression of ICOS in vivo defines CD4<sup>+</sup> effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* *197*, 181-193.

Lyons, A.B., and Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* *171*, 131-137.

- Mahajan, S., Cervera, A., MacLeod, M., Fillatreau, S., Perona-Wright, G., Meek, S., Smith, A., MacDonald, A., and Gray, D. (2007). The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1796-1808.
- Matloubian, M., Somasundaram, T., Kolhekar, S.R., Selvakumar, R., and Ahmed, R. (1990). Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J. Exp. Med.* *172*, 1043-1048.
- Matsuzaki, J., Gnjjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., Eppolito, C., Qian, F., Lele, S., Shrikant, P., *et al.* (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 7875-7880.
- Maxwell, J.R., Campbell, J.D., Kim, C.H., and Vella, A.T. (1999). CD40 activation boosts T cell immunity in vivo by enhancing T cell clonal expansion and delaying peripheral T cell deletion. *J. Immunol.* *162*, 2024-2034.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antiox. Redox. Signal.* *8*, 1775-1789.
- McCune, J.M. (1995). Viral latency in HIV disease. *Cell* *82*, 183-188.
- McKay, P.F., Schmitz, J.E., Barouch, D.H., Kuroda, M.J., Lifton, M.A., Nickerson, C.E., Gorgone, D.A., and Letvin, N.L. (2002). Vaccine protection against functional CTL abnormalities in simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Immunol.* *168*, 332-337.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* *480*, 480-489.
- Merica, R., Khoruts, A., Pape, K.A., Reinhardt, R.L., and Jenkins, M.K. (2000). Antigen-experienced CD4 T cells display a reduced capacity for clonal expansion in vivo that is imposed by factors present in the immune host. *J. Immunol.* *164*, 4551-4557.
- Merlo, A., Turrini, R., Bobisse, S., Zamarchi, R., Alaggio, R., Dolcetti, R., Mautner, J., Zanovello, P., Amadori, A., and Rosato, A. (2010). Virus-specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells for the treatment of EBV-related tumors. *J. Immunol.* *184*, 5895-5902.

Miller, J.D., van der Most, R.G., Akondy, R.S., Glidewell, J.T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P.L., Edupuganti, S., Lalor, S., *et al.* (2008). Human effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28, 710-722.

Moskophidis, D., and Kioussis, D. (1998). Contribution of virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J. Exp. Med.* 188, 223-232.

Moskophidis, D., Laine, E., and Zinkernagel, R.M. (1993a). Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 3306-3311.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R.M. (1993b). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 362, 758-761.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

Mueller, S.N., and Ahmed, R. (2009). High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8623-8628.

Mueller, S.N., Matloubian, M., Clemens, D.M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Gangappa, S., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2007). Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15430-15435.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th edn (New York: Garland Science).

Myers, L., and Hasenkrug, K.J. (2009). Retroviral immunology: lessons from a mouse model. *Immunol. Res.* 43, 160-166.

Myers, L., Messer, R.J., Carmody, A.B., and Hasenkrug, K.J. (2009). Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *J. Immunol.* 183, 1636-1643.

- Nair, S., Bayer, W., Ploquin, M.J., Kassiotis, G., Hasenkrug, K.J., and Dittmer, U. (2011). Distinct roles of CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations in retroviral immunity: lessons from the Friend virus mouse model. *Retrovirology* 8, 76.
- Obst, R., van Santen, H.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4<sup>+</sup> T cell response. *J. Exp. Med.* 201, 1555-1565.
- Obst, R., van Santen, H.M., Melamed, R., Kamphorst, A.O., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Sustained antigen presentation can promote an immunogenic T cell response, like dendritic cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15460-15465.
- Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Paley, M.A., Sharpe, A., and Wherry, E.J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 212, 1125-1137.
- Ohkura, N., Kitagawa, Y., and Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38, 414-423.
- Oldstone, M.B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* 344, 111-118.
- Oxenius, A., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1998). Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity* 9, 449-457.
- Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., *et al.* (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8<sup>+</sup> T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338, 1220-1225.
- Pantaleo, G., and Harari, A. (2006). Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 417-423.
- Pantaleo, G., Soudeyns, H., Demarest, J.F., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Paolucci, S., Daucher, M., Cohen, O.J., Denis, F., Biddison, W.E., *et al.* (1997). Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones during primary HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9848-9853.

- Parisi, S.G., Boldrin, C., Andreis, S., Ferretto, R., Fuser, R., Malena, M., Manfrin, V., Panese, S., Scaggiante, R., Dori, L., *et al.* (2011). KSHV DNA viremia correlates with low CD4<sup>+</sup> cell count in Italian males at the time of diagnosis of HIV infection. *J. Med. Virol.* 83, 384-390.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789.
- Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 36, 265-276.
- Ploegh, H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.
- Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., *et al.* (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* 16, 1147-1151.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747.
- Raziorrouh, B., Schraut, W., Gerlach, T., Nowack, D., Gruner, N.H., Ulsenheimer, A., Zachoval, R., Wachtler, M., Spannagl, M., Haas, J., *et al.* (2010). The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell function. *Hepatology* 52, 1934-1947.
- Reignat, S., Webster, G.J., Brown, D., Ogg, G.S., King, A., Seneviratne, S.L., Dusheiko, G., Williams, R., Maini, M.K., and Bertoletti, A. (2002). Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* 195, 1089-1101.
- Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M.K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101-105.
- Roeleveld, D.M., and Koenders, M.I. (2015). The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine* 74, 101-107.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745-763.

Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., *et al.* (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* 283, 857-860.

Schulze Zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasprovicz, V., Nolan, B.E., Streeck, H., Aneja, J., Reyor, L.L., Allen, T.M., Lohse, A.W., *et al.* (2012). Broadly directed virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J. Exp. Med.* 209, 61-75.

Sebelin-Wulf, K., Nguyen, T.D., Oertel, S., Papp-Vary, M., Trappe, R.U., Schulzki, A., Pezzutto, A., Riess, H., and Subklewe, M. (2007). Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl. Immunol.* 17, 203-210.

Sester, U., Presser, D., Dirks, J., Gartner, B.C., Kohler, H., and Sester, M. (2008). PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am. J. Transplant.* 8, 1486-1497.

Shankar, P., Russo, M., Harnisch, B., Patterson, M., Skolnik, P., and Lieberman, J. (2000). Impaired function of circulating HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96, 3094-3101.

Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2011). Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer* 11, 805-812.

Shepard, C.W., Finelli, L., and Alter, M.J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 5, 558-567.

Shin, H., Blackburn, S.D., Blattman, J.N., and Wherry, E.J. (2007). Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J. Exp. Med.* 204, 941-949.

Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31, 309-320.

Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156, 25-37.

- Stimpfling, J.H., and Richardson, A. (1965). Recombination within the Histocompatibility Locus of the Mouse. *Genetics* 51, 831-846.
- Streeck, H., Brumme, Z.L., Anastario, M., Cohen, K.W., Jolin, J.S., Meier, A., Brumme, C.J., Rosenberg, E.S., Alter, G., Allen, T.M., *et al.* (2008). Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *PLoS Med.* 5, e100.
- Su, F., and Schneider, R.J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8744-8749.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848-862.
- Taylor, J.J., Krawczyk, C.M., Mohrs, M., and Pearce, E.J. (2009). Th2 cell hyporesponsiveness during chronic murine schistosomiasis is cell intrinsic and linked to GRAIL expression. *J. Clin. Invest.* 119, 1019-1028.
- Tham, E.L., and Mescher, M.F. (2002). The poststimulation program of CD4 versus CD8 T cells (death versus activation-induced nonresponsiveness). *J. Immunol.* 169, 1822-1828.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8<sup>+</sup> T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 77, 68-76.
- Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K., and Zuniga, E.I. (2009). Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* 31, 145-157.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.
- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A.N., Albrecht, I., Grun, J.R., Lohning, M., and Radbruch, A. (2009). Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30, 721-730.
- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., and Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* 97, 697-702.



- Tough, D.F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* *179*, 1127-1135.
- Umlauf, S.W., Beverly, B., Lantz, O., and Schwartz, R.H. (1995). Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3197-3205.
- Van den Broeck, W., Derore, A., and Simoons, P. (2006). Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J. Immunol. Methods.* *312*, 12-19.
- van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J. Exp. Med.* *200*, 1221-1230.
- Virgin, H.W., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell* *138*, 30-50.
- Walton, S., Mandaric, S., and Oxenius, A. (2013). CD4 T cell responses in latent and chronic viral infections. *Front. Immunol.* *4*, 105.
- Weiss, A., and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* *76*, 263-274.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *12*, 492-499.
- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* *77*, 4911-4927.
- Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaeche, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* *27*, 670-684.
- Wiesel, M., and Oxenius, A. (2012). From crucial to negligible: functional CD8<sup>+</sup> T-cell responses and their dependence on CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1080-1088.
- Wiesel, M., Walton, S., Richter, K., and Oxenius, A. (2009). Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation. *APMIS* *117*, 356-381.

- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 171-192.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80, 617-653.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J. Exp. Med.* 188, 2205-2213.
- Zarour, H.M. (2016). Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 1856-1864.
- Zehn, D., and Wherry, E.J. (2015). Immune Memory and Exhaustion: Clinically Relevant Lessons from the LCMV Model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 850, 137-152.
- Zelinskyy, G., Kraft, A.R., Schimmer, S., Arndt, T., and Dittmer, U. (2006). Kinetics of CD8<sup>+</sup> effector T cell responses and induced CD4<sup>+</sup> regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. *Eur. J. Immunol.* 36, 2658-2670.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8<sup>+</sup> T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161-168.
- Zhou, S., Ou, R., Huang, L., and Moskophidis, D. (2002). Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J. Virol.* 76, 829-840.
- Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R.M., and Pircher, H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8<sup>+</sup> memory T cells in virus-infected hosts. *J. Exp. Med.* 183, 1367-1375.

**Internetquellen:**

Wold Health Organization, Hepatitis B, Fact sheet 204, unter:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (abgerufen am 10.09.2017)

Wold Health Organization, HIV/AIDS, Fact sheet 164, unter:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/> (abgerufen am 10.09.2017)

Wold Health Organization, The top ten causes of death, Fact sheet 310, unter:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (abgerufen am 10.09.2017)

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Reinhard Obst für die Vergabe des wissenschaftlich interessanten, methodisch spannenden und praktisch relevanten Themas für die Doktorarbeit bedanken. Ich bedanke mich sehr für die einmalige Möglichkeit am Institut für Immunologie experimentell tätig gewesen zu sein und viel wissenschaftlich aber auch persönlich gelernt zu haben. Ich möchte ihm für seine unerschöpfliche Geduld beim Einführen in das wissenschaftliche Arbeiten, beim Erklären und Beantworten von Fragen, für die zahlreichen interessanten Diskussionen, für die stetige Motivation nach neuen Lösungen zu suchen, aus Fehlern zu lernen und weiter zu machen, danken. Vielen Dank dafür, dass ich Gelegenheit hatte die Vielseitigkeit moderner immunologischer Forschung zu erleben, wie etwa während der Autumn school of immunology in Bad Schandau und bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Erlangen. Vielen Dank auch für die vielfältige Möglichkeit die Ergebnisse meiner Doktorarbeit vorzustellen.

Mein herzlicher Dank gilt auch an meinen Mitstreiter und Kollegen Shaobo Han, mit dem wir über viele Monate Seite an Seite an der Banch standen, der immer Tricks und Tipps zur Optimierung vieler Arbeitsprozesse parat hielt, stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und jederzeit für wissenschaftlichen Austausch bereit war.

Ich bedanke mich auch bei Hannah Rabenstein, die immer gute Laune und viel Motivation in den Laboralltag brachte und jederzeit Fragen geduldig und kompetent beantwortet hat.

Vielen herzlichen Dank an Simone Pentz und Anna Kollar die durch Ihre Unterstützung bei der Maustypisierung den Arbeitsverlauf wesentlich beschleunigten.

Grundsätzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie der LMU für Ihre Vorbildfunktion und die Inspiration, die Sie mir schenkten, bedanken.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Schreibbüros der Fakultät 13 der LMU München für die wertvollen Hinweise zur sprachlichen und graphischen Verbesserung.

Ein großer Dank gilt auch an die Ludwig-Maximilians-Universität München, die mich und das Projekt im Rahmen des FöFoLE-Programms finanziell förderte und wesentlich zur meiner methodologischen und wissenschaftlichen Schulung beitrug.

Zuletzt möchte ich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die meiner Arbeit stets mit Interesse begegneten, mich mit Fragen zum Denken veranlassten, mich ermutigten und aufforderten weiter zu machen.

## Eidesstattliche Versicherung

Asoyan, Ayuna

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Einfluss der Antigendosis auf den Phänotyp erschöpfter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.01.2019

Asoyan, Ayuna

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand